

ZUR BIOSYNTHESE VON CYTOCHALASIN D

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie
vorgelegt der
Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel

von
Claude-René Lebet
aus Buttes NE

Basel 1973

ZUR BIOSYNTHESE VON CYTOCHALASIN D

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie

vorgelegt der

Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Basel

von

Claude-René Lebet

aus Buttes NE

Basel 1973

Genehmigt von der Philosophisch-
Naturwissenschaftlichen Fakultät
auf Antrag der

Herren Professoren Dr. Ch. Tamm
Dr. C. A. Grob

Basel, den 18. Dezember 1973

M. Eichler

Prof. Dr. M. Eichler

Dekan



Die vorliegende Arbeit wurde in den
Laboratorien des Instituts für
Organische Chemie der Universität
Basel unter der Leitung von
Herrn Professor Dr. Ch. Tamm
ausgeführt.

Meinem Lehrer, Herrn Professor Tamm,
danke ich herzlich für das rege Inter-
esse an der vorliegenden Arbeit und
seine stete Bereitschaft, bei der
Lösung chemischer wie auch persönlicher
Probleme mitzuhelfen.

Ihm, wie auch meinen Kollegen, bin ich
für das angenehme Arbeitsklima zu
Dank verpflichtet.

Une découverte scientifique quelle qu'elle soit, peut être énoncée en peu de mots; et sa démonstration ne réclame qu'un petit nombre d'expériences. Mais si l'on cherche à se rendre compte de son origine, on est frappé de la lenteur avec laquelle elle a pris naissance. Elle n'est jamais l'oeuvre d'un seul homme et chacun de ceux qui y ont concouru lui ont donné bien des veilles.

Louis Pasteur

1. THEORETISCHER TEIL

1. Einführung. - 1.1. Die Vergleichende Literaturwissenschaft. - 1.2. Grundriss der Vergleichenden Literaturwissenschaft. - 1.3. Aufgaben der Vergleichenden Literaturwissenschaft. 10
2. Methoden der Vergleichenden Literaturwissenschaft. - 2.1. Allgemeines. - 2.2. Spezifische Methoden. 20
3. Vergleichende Literaturwissenschaft und andere Disziplinen. 30
4. Die Entwicklung der Vergleichenden Literaturwissenschaft. 40
5. Die Aufgaben der Vergleichenden Literaturwissenschaft. 50
6. Die Methoden der Vergleichenden Literaturwissenschaft. 60
7. Die Ergebnisse der Vergleichenden Literaturwissenschaft. 70
8. Die Bedeutung der Vergleichenden Literaturwissenschaft. 80
9. Die Zukunft der Vergleichenden Literaturwissenschaft. 90
10. Die Aufgaben der Vergleichenden Literaturwissenschaft. 100
11. Die Methoden der Vergleichenden Literaturwissenschaft. 110
12. Die Ergebnisse der Vergleichenden Literaturwissenschaft. 120
13. Die Bedeutung der Vergleichenden Literaturwissenschaft. 130
14. Die Zukunft der Vergleichenden Literaturwissenschaft. 140
15. Die Aufgaben der Vergleichenden Literaturwissenschaft. 150
16. Die Methoden der Vergleichenden Literaturwissenschaft. 160
17. Die Ergebnisse der Vergleichenden Literaturwissenschaft. 170
18. Die Bedeutung der Vergleichenden Literaturwissenschaft. 180
19. Die Zukunft der Vergleichenden Literaturwissenschaft. 190
20. Die Aufgaben der Vergleichenden Literaturwissenschaft. 200

A ma femme

2. HISTORISCHER TEIL

1. Einführung. 20
2. Die Entwicklung der Vergleichenden Literaturwissenschaft. 30
3. Die Aufgaben der Vergleichenden Literaturwissenschaft. 40
4. Die Methoden der Vergleichenden Literaturwissenschaft. 50
5. Die Ergebnisse der Vergleichenden Literaturwissenschaft. 60
6. Die Bedeutung der Vergleichenden Literaturwissenschaft. 70
7. Die Zukunft der Vergleichenden Literaturwissenschaft. 80
8. Die Aufgaben der Vergleichenden Literaturwissenschaft. 90
9. Die Methoden der Vergleichenden Literaturwissenschaft. 100
10. Die Ergebnisse der Vergleichenden Literaturwissenschaft. 110
11. Die Bedeutung der Vergleichenden Literaturwissenschaft. 120
12. Die Zukunft der Vergleichenden Literaturwissenschaft. 130
13. Die Aufgaben der Vergleichenden Literaturwissenschaft. 140
14. Die Methoden der Vergleichenden Literaturwissenschaft. 150
15. Die Ergebnisse der Vergleichenden Literaturwissenschaft. 160
16. Die Bedeutung der Vergleichenden Literaturwissenschaft. 170
17. Die Zukunft der Vergleichenden Literaturwissenschaft. 180
18. Die Aufgaben der Vergleichenden Literaturwissenschaft. 190
19. Die Methoden der Vergleichenden Literaturwissenschaft. 200
20. Die Ergebnisse der Vergleichenden Literaturwissenschaft. 210

INHALTSVERZEICHNIS

<u>A. Theoretischer Teil</u>	<u>Seite</u>
1. <u>Einleitung</u> . - 1.1. Die Cytochalasane. -	1
1.2. Nomenklatur der Cytochalasane. -	
1.3. Biologische Wirkungen der Cytochalasane	
2. <u>Biogenese der Cytochalasane</u> . - 2.1. Allgemeine Prinzipien. - 2.2. Biosynthese von Phomin (<u>2</u>)	10
3. <u>Problemstellung</u>	13
4. <u>Wahl des Mikroorganismus und Isolierung des entsprechenden Metaboliten</u> . - 4.1. Metarrhizium anisopliae. - 4.2. Zygosporium masonii	16
5. <u>Bildungskurve von Cytochalasin D (<u>5</u>)</u>	20
6. <u>Biosynthese von Cytochalasin D (<u>5</u>)</u> . - 6.1. Hypo- thetische Biosynthesewege. - 6.2. Auswahl und Verabreichung geeigneter Vorläufer. - 6.3. Chemi- scher Abbau von Cytochalasin D (<u>5</u>). - 6.4. Resul- tate der Abbauversuche mit radioaktivem Cyto- chalasin D (<u>5</u>). - 6.5. Diskussion der Resultate	23
7. <u>Anhang: Struktur des 22-Oxa-[<u>12</u>]cytochalasans <u>41</u></u> . -	62
7.1. Isolierung von <u>41</u> . - 7.2. Ableitung der Struk- tur von <u>41</u> aus den Spektraldaten. - 7.3. Hypothesi- scher Bildungsmechanismus von <u>41</u>	
 <u>B. Experimenteller Teil</u>	
1. <u>Allgemeines</u>	76
2. <u>Züchtung der Mikroorganismen und Isolierung der Metabolite</u> . - 2.1. Züchtung von Metarrhizium anisopliae. - 2.2. Extraktion der Antibiotica aus Kulturen von Metarrhizium anisopliae. - 2.3. Züchtung von Zygosporium masonii. - 2.4. Isolie- rung von Cytochalasin D (<u>5</u>) aus Kulturen von Zygosporium masonii	77

	<u>Seite</u>
3. <u>Abbausequenz 1.</u> - 3.1. Dodecahydrocytochalasin D (<u>16</u>). - 3.2. Desacetyldodecahydrocytochalasin D (<u>17</u>). - 3.3. Kuhn-Roth-Oxidation von Desacetyldodecahydrocytochalasin D (<u>17</u>). - 3.4. Schmidt-Abbau von Natriumacetat (<u>19</u>)	81
4. <u>Abbausequenz 2.</u> - 4.1. Desacetylcytochalasin D (<u>24</u>). - 4.2. Kuhn-Roth-Oxidation von Desacetylcytochalasin D (<u>24</u>)	85
5. <u>Abbausequenz 3.</u> - 5.1. Ozonolyse von Cytochalasin D (<u>5</u>) mit reduktiver Spaltung der Ozonide mit NaBH_4 . - 5.2. Acetylierung des Ozonolysengemisches. - 5.3. Trennung des acetylierten Ozonolysengemisches	87
6. <u>Abbausequenz 4.</u> - 6.1. Hydrolytische Spaltung von Cytochalasin D (<u>5</u>). - 6.2. Veresterung des Säurengemisches mit Diazomethan	91
7. <u>Abbausequenz 5.</u> - 7.1. Dihydrocytochalasin D (<u>37</u>). - 7.2. Perjodatspaltung von Dihydrocytochalasin D (<u>37</u>). - 7.3. Jodoformreaktion von <u>38</u>	94
8. <u>Das 22-Oxa-[12]cytochalasan 41</u>	96
<u>C. Zusammenfassung</u>	97
<u>D. Literaturverzeichnis</u>	100
<u>E. Curriculum vitae</u>	103

A. THEORETISCHER TEIL

1. Einleitung

1.1. Die Cytochalasane

In den letzten Jahren ist aus Mikroorganismen eine Reihe cytostatisch wirksamer Metabolite isoliert worden. Diese chemisch eng miteinander verwandten Verbindungen gehören einem neuartigen Strukturtypus an, in dem eine hochsubstituierte, hydrierte Isoindolon-Einheit mit einem 11- bis 14-gliedrigen Makrocyclus verknüpft ist. Bis heute sind 15 Vertreter dieser seit 1966 bekannten Stoffklasse isoliert worden; sie werden Cytochalasane genannt.

Die Strukturaufklärung der beiden ersten Cytochalasane gelang etwa gleichzeitig und unabhängig voneinander in Basel durch Rothweiler und Tamm [1] [2] und in England durch Aldridge et al. [3] [4] in den Forschungslaboratorien der ICI Ltd. Die in Basel aus Kulturfiltraten des Mikroorganismus Phoma, Stamm S 298, isolierten Verbindungen erhielten die Namen Phomin (2) und Dehydrophomin (3), in Analogie zum Namen des Mikroorganismus, die bei der ICI aus Kulturen von Helminthosporium dematioideum gewonnen die Namen Cytochalasin A (3) und B (2). Die Benennung bezieht sich hier auf die biologische Wirksamkeit der beiden Metabolite; sie leitet sich ab von cytos, Zelle und chalasis, Erschlaffung. Ein direkter Vergleich zeigte die Identität von Phomin (2) mit Cytochalasin B und von Dehydrophomin (3) mit Cytochalasin A.

Durch die Röntgen-Strukturanalyse des Silbertetrafluoroborat-Komplexes von Phomin (2) konnte die relative Konfiguration von Phomin (2) bestimmt werden. Nach der Verknüpfung eines Abbauproduktes mit (+)-Pulegon wurde auch die absolute Konfiguration ermittelt [5].

Wenig später berichtete die englische Forschergruppe über die Strukturaufklärung zweier weiterer Cytochalasane, die aus Kulturen von Metarrhizium anisopliae isoliert worden waren [6]. Unglücklicherweise wurden auch diese beiden Verbindungen, die zwar chemisch eng verwandt mit den Cytochalasinen A (3) und B (2) sind, aber einem anderen Grundtypus der Cytochalasane angehören, nach der biologischen Wirkung Cytochalasin C (4) und D (5) benannt.

Genau wie im Fall von Phomin (2) wurde auch die Struktur von Cytochalasin D (5) ein zweites Mal aufgeklärt. Minato et al. [7] [8] beschrieben nämlich ein in den Forschungslaboratorien der Shionogi and Co. Ltd., Japan, aus Kulturen von Zygosporium masonii isoliertes neues Antibioticum, das nach dem Mikroorganismus Zygosporin A (5) genannt wurde. Aufgrund von noch vor Aufklärung der Struktur veröffentlichten Daten von Zygosporin A (5) schlossen Aldridge und Turner [9], dass die Verbindung mit Cytochalasin D (5) identisch sei.

Die Röntgen-Strukturanalyse des p-Brombenzoesäureesters eines Derivats von Cytochalasin D (5) lieferte zunächst die relative Konfiguration von Cytochalasin D (5) [10]. Ausführliche Berechnungen ergaben schliesslich auch hier die absolute Konfiguration [11]. Die Stereochemie von Cytochalasin D (5) erwies sich, im Bereich gleicher Struktur, mit der Stereochemie von Phomin (2) identisch.

Aus den Fermentationen von Zygosporium masonii wurden ausserdem einige in geringer Menge gebildete Metabolite, die Zygosporine D (6), E (7), F (8) und G (9), isoliert, die alle Varianten von Cytochalasin D (5) sind [12].

1972 veröffentlichten Aldridge et al. [13] die Strukturen der nächsten zwei Cytochalasane, Cytochalasin F (1) und E (10). Die vorgeschlagenen Strukturen erwiesen sich jedoch später als falsch und wurden 1973 von denselben Autoren korrigiert [14].

Cytochalasin F (1) wurde aus Kulturen von Helminthosporium dematioides erhalten und ist ein Isomeres von Phomin (2). Cytochalasin E (10), ein Stoffwechselprodukt von Rosellinia necatrix, ist der erste Vertreter des dritten Grundtypus der Cytochalasane, der 21,23-Dioxa-[13]cytochalasane.

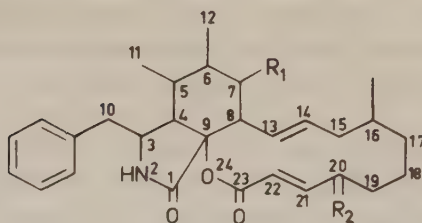
Kurz darauf publizierten Büchi et al. [15] die Resultate der Röntgen-Strukturanalyse eines Silbernitrat-Wasser-Komplexes von Cytochalasin E (10) und legten damit Struktur und absolute Konfiguration von Cytochalasin E (10) endgültig fest. Der Metabolit wurde von ihnen aus Kulturen von Aspergillus clavatus isoliert.

Vor kurzem gelang es Binder und Tamm [16] [17], die Strukturen dreier weiterer Cytochalasane aufzuklären. Die aus Kulturfiltraten von Phoma, Stamm S 298, neben Phomin (2) in geringer Menge isolierten Verbindungen, stellen mit ihrem 13-gliedrigen carbocyclischen Ring einen neuen Cytochalasan-Grundtypus dar. Der Hauptvertreter dieser Gruppe ist Desoxaphomin (11) [16], der seinen Namen der strukturellen Verwandtschaft mit Phomin (2) verdankt. Die zwei anderen Verbindungen wurden Proxi-phomin (12) und Protophomin (13) [17] genannt, da sie sehr wahrscheinlich biogenetische Vorläufer von Phomin (2) sind.

Schliesslich berichteten Sekita et al. [18] über zwei Verbindungen aus Kulturen von Chaetomium globosum, die zur Reihe der [13]Cytochalasane gehören, wobei zum ersten Mal anstelle des Phenylrestes ein Indolylrest auftritt. In Analogie zum Namen des Mikroorganismus wurden sie Chaetoglobosin A (14) und B (15) genannt.

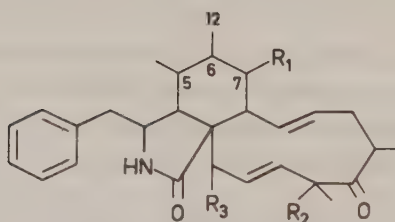
Die Strukturformeln der hier beschriebenen Cytochalasane sind in Fig. 1 zusammengestellt. Die Bezifferung richtet sich nach der einheitlichen Nomenklatur von Binder et al. [19] (vgl. Kapitel 1.2.).

24-Oxa-[14]cytochalasane



- (1) 6,7-Epoxy, $R_1 = H$, $R_2 = H, OH$: Cytochalasin F
 (2) $\Delta^{6,12}$ $R_1 = OH$, $R_2 = H, OH$: Phomin
 (3) $\Delta^{6,12}$ $R_1 = OH$, $R_2 = O$: Dehydrophomin

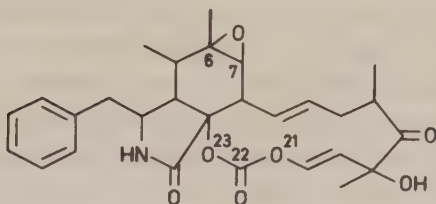
[11]Cytochalasane



- (4) $\Delta^{5,6}$ $R_1 = R_2 = OH$, $R_3 = OAc$: Cytochalasin C
 (5) $\Delta^{6,12}$ $R_1 = R_2 = OH$, $R_3 = OAc$: Cytochalasin D
 (6) $\Delta^{6,12}$ $R_1 = R_2 = R_3 = OH$: Zygosporin D
 (7) $\Delta^{6,12}$ $R_1 = R_3 = OAc$, $R_2 = OH$: Zygosporin E
 (8) $\Delta^{6,12}$ $R_1 = OH$, $R_2 = H$, $R_3 = OAc$: Zygosporin F
 (9) $\Delta^{6,7}$ $R_1 = H$, $R_2 = OH$, $R_3 = OAc$: Zygosporin G

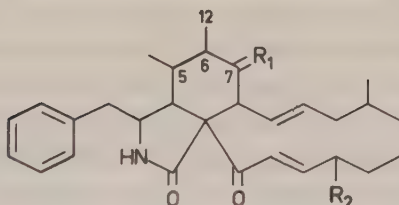
Fig. 1: Strukturen der natürlichen Cytochalasane

21,23-Dioxa-[13]cytochalasane

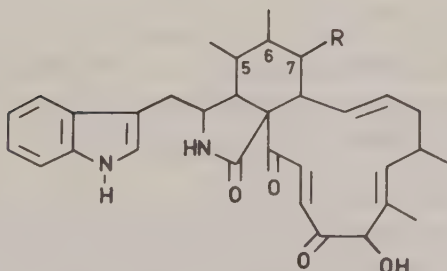


(10) Cytochalasin E

[13]Cytochalasane



- (11) $\Delta^{6,12}$ $R_1 = \text{H, OH}$, $R_2 = \text{OH}$: Desoxaphomin
 (12) $\Delta^{6,7}$ $R_1 = \text{H}_2$, $R_2 = \text{H}$: Proxiphomin
 (13) $\Delta^{5,6}$ $R_1 = \text{O}$, $R_2 = \text{H}$: Protophomin



- (14) 6,7-Epoxy, $R = \text{H}$: Chaetoglobosin A
 (15) $\Delta^{5,6}$ $R = \text{OH}$: Chaetoglobosin B

1.2. Nomenklatur der Cytochalasane

Ursprung und Benennung der Cytochalasane sind wie erwähnt recht verschieden. Genau so unterschiedlich war auch die Bezifferung der Grundgerüste, da jede Arbeitsgruppe ihr eigenes System verwendete. Um diese Verwirrung aufzulösen, haben Binder und Tamm mit der ICI- und Shionogi-Gruppe zusammen vor kurzem ein einheitliches, systematisches Nomenklatursystem für alle Cytochalasane vorgeschlagen [19]. Das neue System hat den Vorteil, dass sich nur in den Teilen der Molekel, die sich chemisch voneinander unterscheiden, andere Bezifferungen ergeben.

In Tabelle 1 sind die fünfzehn bisher isolierten Cytochalasane mit ihren Trivialnamen und den systematischen Namen zusammengestellt. Wegen der Schwerfälligkeit der systematischen Namen verwenden wir im Text dennoch, wenn es sich um ein spezifisches Cytochalsan handelt, den in Tabelle 1 aufgeführten Trivialnamen. Um jedoch Vergleiche zwischen den verschiedenen Cytochalasanen zu erleichtern, wird ausschliesslich die neue, einheitliche Numerierung verwendet.

Die Arbeiten über Strukturaufklärung, chemische und physikalische Reaktionen sind kürzlich von Binder und Tamm [20] zusammenfassend dargestellt worden.

1.3. Biologische Wirkungen der Cytochalasane

Alle Cytochalasane hemmen die Spaltung des Cytoplasmas in Säugetierzellkulturen, unterscheiden sich jedoch voneinander in der Stärke ihrer Wirkung.

In Gegenwart von Phomin (2) ($1 \mu\text{g/ml}$) findet bei Säugetierzellen eine normale Zellkernteilung statt, wobei die Cytokinese, die Spaltung des Zellplasmas, blockiert bleibt [21] [22] [23]. Längerer Kontakt mit Phomin (2) bewirkt das Entstehen grosser, multinuclearer Zellen. Interessant ist hier, dass sich die Zahl

der Zellkerne pro Mitose nicht verdoppelt, sondern jeweils nur ein neuer Kern hinzukommt.

Hohe Konzentrationen von Phomin (2), etwa das 10- bis 20-fache der Menge, die zur Hemmung der Cytokinese benötigt wird, führen zur Ausstossung des Zellkerns. Wenn dieser Prozess noch nicht beendet ist, lässt er sich genau wie die Cytostase durch Entfernen des Cytochalasans umkehren; die Störungen sind also reversibel.

Cytochalasin C (4) und D (5) besitzen ungefähr die zehnfache cytostatische Aktivität von Phomin (2). Aufgrund der starken ödem- und abszesshemmenden Eigenschaften von Cytochalasin D (5) an Ratten, liess sich die japanische Forschergruppe die Herstellung der Verbindung (aus dem genannten Mikroorganismus) und ihre Anwendung in der Therapie patentieren [24]. Eine humanmedizinische Applikation scheint nicht ausgeschlossen. Wie aus neueren Patentschriften hervorgeht [25], versuchen die japanischen Forscher durch Einführung modifizierter Substituenten in das Cytochalasangerüst und durch Herstellung von Derivaten, die Toxizität von Cytochalasin D (5) herabzusetzen ohne die entzündungshemmenden Eigenschaften dadurch abzuschwächen. Angestrebt wird ein Präparat, das die therapeutischen Eigenschaften der Adrenocorticoide besitzt, jedoch nicht ihre unerwünschten Nebenwirkungen.

Ein weiterer allgemeiner Effekt der Cytochalasane ist ihre Hemmung der Zellbewegung. Die Zellränder werden ruhig; die Zelle nimmt schliesslich die Form einer dünnen Scheibe an. Dieser Einfluss auf die Zell-Motilität findet seine Anwendung in der Krebsforschung.

Der Bereich weiterer biologischer Aktivitäten der Cytochalasane ist beträchtlich. Wir können im Rahmen dieser Arbeit nicht darauf eingehen und verweisen auf den Uebersichtsartikel von Carter [26].

Tabelle 1: Zusammenstellung der

Nr.	Trivialname	Systematischer Name
<u>24-Oxa-[14]cytochalasane</u>		
(1)	Cytochalasin F	6,7-Epoxy-20-hydroxy-16-methyl-10-phenyl- -24-oxa-[14]cytochalasa-13 ^t ,21 ^t -dien- -1,23-dion
(2)	<u>Phomin</u> = Cytochalasin B	(7S,16R,20R)-7,20-Dihydroxy-16-methyl-10- -phenyl-24-oxa-[14]cytochalasa-6(12),13 ^t , 21 ^t -trien-1,23-dion
(3)	<u>Dehydrophomin</u> = Cytochalasin A	(7S,16R)-7-Hydroxy-16-methyl-10-phenyl- -24-oxa-[14]cytochalasa-6(12),13 ^t ,21 ^t - -trien-1,20,23-trion
<u>[11]Cytochalasane</u>		
(4)	Cytochalasin C	(7S,16S,18R,21R)-21-Acetoxy-7,18-dihydr- oxy-16,18-dimethyl-10-phenyl-[11]cytocha- lasa-5(6),13 ^t ,19 ^t -trien-1,17-dion
(5)	<u>Cytochalasin D</u> = Zygosporin A	(7S,16S,18R,21R)-21-Acetoxy-7,18-dihydr- oxy-16,18-dimethyl-10-phenyl-[11]cyto- chalasa-6(12),13 ^t ,19 ^t -trien-1,17-dion
(6)	Zygosporin D	(7S,16S,16R,21R)-16,18-Dimethyl-10-phen- yl-7,18,21-trihydroxy-[11]cytochalasa-6 (12),13 ^t ,19 ^t -trien-1,17-dion
(7)	Zygosporin E	(7S,16S,21R)-21-Acetoxy-7-hydroxy-16,18- dimethyl-10-phenyl-[11]cytochalasa-6(12), 13 ^t ,19 ^t -trien-1,17-dion
(8)	Zygosporin F	(7S,16S,18R,21R)-7,21-Diacetoxy-16,18-di- methyl-18-hydroxy-10-phenyl-[11]cytocha- lasa-6(12),13 ^t ,19 ^t -trien-1,17-dion

natürlichen Cytochalasane

Nr.	Trivialname	Systematischer Name
(9)	Zygosporin G	(16S,18R,21R)-21-Acetoxy-16,18-dimethyl-18-hydroxy-10-phenyl-[11]cytochalasa-6(7)-13 ^t ,19 ^t -trien-1,17-dion
		<u>21,23-Dioxa-[13]cytochalasane</u>
(10)	Cytochalasin E	16,18-Dimethyl-6,7-epoxy-18-hydroxy-10-phenyl-21,23-dioxa-[13]cytochalasa-13 ^t ,19 ^t -dien-1,17,22-trion
		<u>[13]Cytochalasane</u>
(11)	Desoxaphomin	(7S,16R,20R)-7,20-Dihydroxy-16-methyl-10-phenyl-[13]cytochalasa-6(12),13 ^t ,21 ^t -trien-1,23-dion
(12)	Proxiphomin	16-Methyl-10-phenyl-[13]cytochalasa-6(7)-13 ^t ,21 ^t -trien-1,23-dion
(13)	Protophomin	16-Methyl-10-phenyl-[13]cytochalasa-5(6)-13 ^t ,21 ^t -trien-1,7,23-trion
(14)	Chaetoglobosin A	16,18-Dimethyl-6,7-epoxy-19-hydroxy-10-(3-indolyl)-[13]cytochalasa-13 ^t ,17 ^t ,21 ^t -trien-1,20,23-trion
(15)	Chaetoglobosin B	7,19-Dihydroxy-16,18-dimethyl-10-(3-indolyl)-[13]cytochalasa-5(6),13 ^t ,17 ^t ,21 ^t -tetraen-1,20,23-trion.

2. Biogenese der Cytochalasane

2.1. Allgemeine Prinzipien

Die Aehnlichkeit der Partialstrukturen der Cytochalasane mit den Makroliden einerseits und den aromatischen Aminosäure-Antibiotica andererseits lässt die Vermutung aufkommen, dass diese rein formale strukturelle Verwandtschaft auf einer gemeinsamen Biogenese beruhen könnte.

Charakteristisch für die Biosynthese der Makrolide ist der Einbau von Acetat- und Propionat-Einheiten in den Lactonteil der Molekel. Der Aufbau aus Acetat-Einheiten weist auf Analogien zur Biosynthese der Fettsäuren hin [27].

Man versteht heute unter der Biosynthese der Fettsäuren die Reaktion einer enzymgebundenen Starter-Einheit wie Acetat oder Propionat mit dem Kettenverlängerungs-Reagens Malonyl-Co-enzym A, welches durch enzymkatalysierte Carboxylierung von Acetat entsteht [28]. Dabei wird die Kette um je 2 C-Atome verlängert. Die so gebildete β -Dicarbonyl-Verbindung durchläuft dann mehrere Reduktionsschritte und ergibt schliesslich die gesättigte aliphatische Carbonsäure, die 2 C-Atome mehr enthält als die Starter-Einheit und enzymgebunden vorliegt. In dieser Art wird die Kette weiter verlängert, bis eine C_{16} - oder C_{18} -Stufe erreicht ist. Ebenfalls möglich ist eine Kettenverlängerung mit 2-Methylmalonyl-Coenzym A, welches aus Propionat durch enzymkatalysierte Carboxylierung entsteht. Das Resultat sind Kettenverzweigungen in Form von Methylgruppen.

Dieses Biosyntheseschema lässt sich auch auf den Lactonteil der Makrolide übertragen. Ob die Reduktionsschritte hier wie bei der Fettsäuresynthese erfolgen oder ob die vielfältigen, das Grundgerüst modifizierenden Reaktionen erst im Stadium eines hypothetischen Polyketids einsetzen, kann noch nicht gesagt werden.

Spielt bei den Makroliden eine Polyketidkette die wichtigste Rolle, so erfolgt der Aufbau ausgehend von aromatischen Aminosäuren nach einem anderen Biosyntheseprinzip. Diese Aminosäuren entstehen aus Abbauprodukten des Zuckerstoffwechsels. Aus Phosphoenolpyruvat und Erythrose-4-phosphat wird in einer Reihe von Schritten Shikimisäure synthetisiert, aus welcher dann über die Prephensäure die beiden aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin entstehen [28].

Der Syntheseweg von Tryptophan zweigt nach der Shikimisäure ab. Die zunächst gebildete Anthranilsäure reagiert mit 5-O-Phospho- α -D-ribosyl-pyrophosphat zu einem offenkettigen, N-glykosidisch gebundenen Zuckeraddukt, welches die Cyclisation zum Fünfring eingeht. Das so erhaltene l-Indolyl-glycerin-3-phosphat wird anschliessend von der aliphatischen Aminosäure Serin substituiert. Dabei entsteht Tryptophan unter Abspaltung von Glycerin-3-phosphat [29] [30].

Aromatische Aminosäuren sind die Bausteine zahlreicher mikrobieller Sekundärmetabolite und solcher aus höheren Pflanzen, z. B. der Alkaloide.

2.2. Biosynthese von Phomin (2)

Die hypothetischen Querverbindungen zu den Makroliden und Aminosäure-Antibiotica regten 1970 Binder, Kiechel und Tamm [31] [20] zu den entsprechenden experimentellen Studien an Phomin (2) mit Hilfe von radioaktiv markierten Vorläufern an. Es zeigte sich, dass Phomin (2) in der Tat ein Antibioticum von gemischtem biogenetischem Ursprung ist. Die Aminosäure Phenylalanin wird direkt und einschliesslich der Carboxylgruppe in den Lactamteil der Molekel eingebaut. Der Rest des Moleküls besteht aus neun Acetat-Einheiten, von denen acht durch Kopf-Schwanz-Kondensationen verknüpft vorliegen. Die neunte Acetat-Einheit ist isoliert, liegt aber möglicherweise ursprünglich mit den acht anderen verknüpft als Nonaketid vor und wird erst später

durch Insertion eines Sauerstoffatoms abgetrennt. Als Starter-Einheit des Nonaketids oder dessen biogenetischen Aequivalents dient Acetat; die Kettenverlängerung wird durch Malonat bewirkt. Die zwei C_1 -Reste stammen aus Methionin (vgl. Fig. 2).

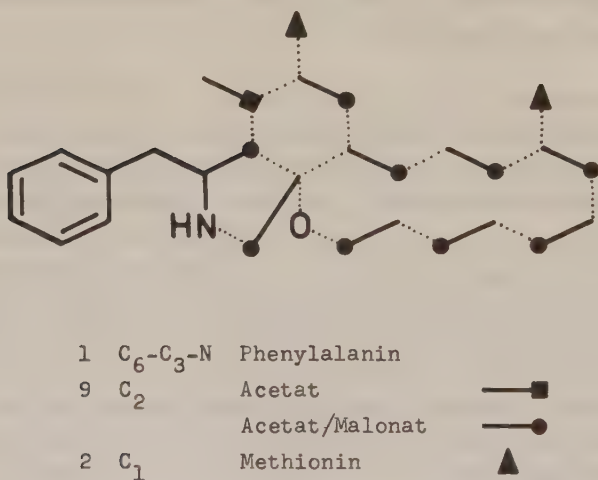


Fig. 2 Die Grundbausteine der Biosynthese von Phomin (2)

Allgemein wird heute angenommen [28], dass sich zunächst aus Acetat- und Malonat-Einheiten durch Kopf-Schwanz-Kondensation eine hypothetische β -Polycarbonylverbindung, ein sogenanntes Polyketid bildet. Im vorliegenden Fall von Phomin (2) entsteht das oben erwähnte Nonaketid. Weitere Reaktionen dieses Polyketids bzw. seines biogenetischen Aequivalents finden dann auf der Oberfläche eines substratspezifischen Enzyms statt, an welche das Polyketid zunächst fixiert bleibt. Die Oberflächenstruktur des Enzyms bedingt also die Stereochemie und die Funktionalität des Reaktionsprodukts.

Es ist bekannt, dass anstelle des hypothetischen Polyketids auch eine gesättigte oder ungesättigte Fettsäure als direkter Vorläufer eines acetat-abgeleiteten Sekundärmetaboliten in Frage kommen kann [32]. Entsprechende Versuche mit [$1\text{-}^{14}\text{C}$]-Na-Linolenat und [$16\text{-}^{14}\text{C}$]-Na-Palmitat (als Äquivalent eines Oktaketids) verliefen allerdings negativ [33]. Der Abbau zeigte, dass die geringe inkorporierte Aktivität homogen über das Molekül verteilt war. Es ist demnach wahrscheinlicher, dass sich der Acetogeninteil von Phomin (2) von einer höheren Oxidationsstufe, also dem Polyketid oder einem biogenetischen Äquivalent, ableitet als von der weitgehend reduzierten Form, d.h. der Fettsäure.

Ueber Zwischenprodukte und Cyclisationsmechanismen bei der Biosynthese von Phomin (2) sind gegenwärtig nur Spekulationen möglich (vgl. [20]). Als Initialschritt kann die amidartige Verknüpfung des hypothetischen Nonaketids mit Phenylalanin betrachtet werden. Die folgenden Kondensations- und Cyclisations-schritte würden dann zu einem carbocyclischen Vorläufer von Phomin (2) führen, in den nun die zwei benötigten C_1 -Einheiten eingeführt würden. Erst zu einem späteren Zeitpunkt würde aus dem grossen carbocyclischen Ring durch Insertion eines Sauerstoffatoms im Sinne einer Baeyer-Villiger-Oxidation der Lactonring von Phomin (2) entstehen.

Das kürzlich isolierte Desoxaphomin (11) könnte den postulierten, carbocyclischen Vorläufer von Phomin (2) darstellen [16]. Der Einbau einer radioaktiven Probe von Desoxaphomin (11) sollte Klarheit über dessen Vorläufer-Funktionen verschaffen. Untersuchungen in diesem Sinne sind im Gange.

3. Problemstellung

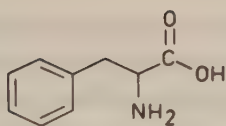
Betrachtet man die im vorigen Kapitel beschriebene Biosynthese von Phomin (2) als repräsentativ für die ganze Stoffklasse, so lassen sich die bisher bekannten Cytochalasane in zwei biogenetische Hauptgruppen einteilen, nämlich einerseits

in Cytochalasane, die ein Nonaketid einbauen und dementsprechend 13 C-Atome im Makrocyclus besitzen und andererseits in Cytochalasane, die aus einem Oktaketid entstehen und demzufolge nur noch 11 C-Atome im Grossring aufweisen. Die Sauerstoffatome werden vermutlich erst später in den Ring eingeführt. Zur ersten Reihe gehören die [13]Cytochalasane und die 24-Oxa-[14]cytochalasane, zur zweiten die [11]Cytochalasane und die 21,23-Dioxa-[13]cytochalasane (vgl. Formelschema 1).

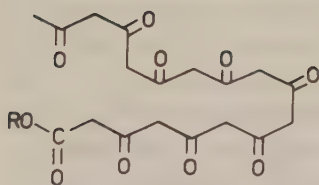
Um die Klarheit des Formelschemas zu bewahren, wurden die Chaetoglobosine ausgelassen. Sie gehören zwar zur Gruppe der [13]Cytochalasane und bauen also ein Nonaketid ein, unterscheiden sich aber von den anderen Cytochalasanen durch den Einbau von Tryptophan anstelle von Phenylalanin.

Um dieses hypothetische Biogeneseschema zu erhärten, mussten nun Untersuchungen an einem Vertreter der Oktaketid-Reihe unternommen werden. Erst die daraus gewonnenen Daten werden, zusammen mit den Phomin (2)-Resultaten, ein Gesamtkonzept der Biogenese der Cytochalasane ergeben. Die Wahl dieses Vertreters fiel, als die vorliegende Arbeit in Angriff genommen wurde, nicht schwer, da aus der Oktaketid-Reihe nur zwei Verbindungen bekannt waren: Cytochalasin C (4), das man neben geringen Mengen von Cytochalasin D (5) aus Metarrhizium anisopliae isolieren kann, und Cytochalasin D (5), das in guter Ausbeute aus Zygosporium masonii gewonnen wird.

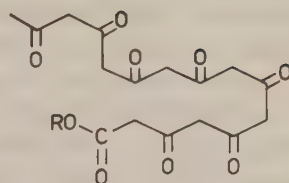
Das Ziel der vorliegenden Dissertation war es nun, den meistproduzierenden Mikroorganismus zu ermitteln, geeignete biogenetische Vorläufer auszuwählen, diese in ^{14}C -markierter Form an Kulturen des Mikroorganismus zu verabreichen und das gebildete Antibioticum zu isolieren. Im Falle einer Inkorporation der ^{14}C -markierten Verbindung sollte die genaue Verteilung der Radioaktivität im Antibioticum mit Hilfe eines gezielten Abbaus der Molekel bestimmt werden. Allfällig dabei isolierte neue Verbindungen sollten charakterisiert werden.



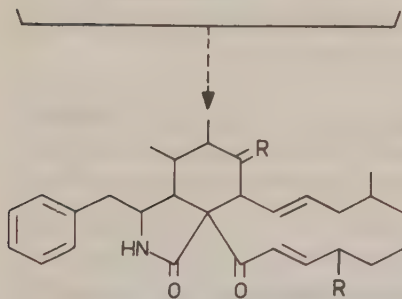
Phenylalanin



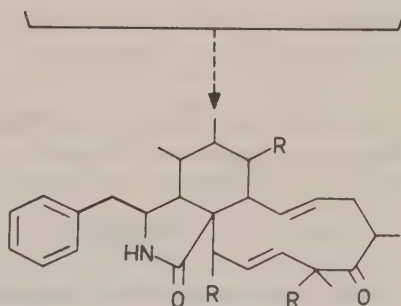
Nonaketid



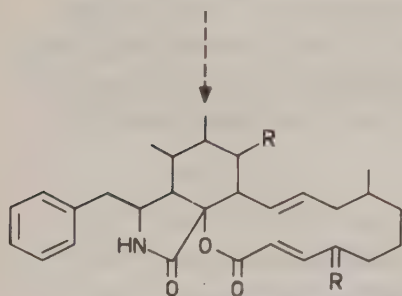
Oktaketid



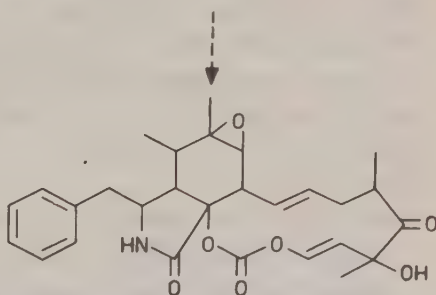
[13]Cytochalasane



[11]Cytochalasane



24-Oxa-[14]cytochalasane



21,23-Dioxa-[13]cytochalasane

Formelschema 1: Hypothetisches Biogeneseschema der Cytochalasane

In neuerer Zeit wird zur Lösung biosynthetischer Probleme vermehrt die ^{13}C -NMR-Spektroskopie eingesetzt. Diese Methode erlaubt nach Einbau geeigneter ^{13}C -markierter Vorläufer, die Verteilung der Markierung in der Molekel direkt zu bestimmen. Sie bringt eine enorme Zeitersparnis, da der meist aufwendige chemische Abbau der Molekel entfällt.

Bei Beginn der vorliegenden Arbeit befand sich diese Methode noch in der Entwicklung. Das Erreichen eines genügend signifikanten Einbaus und die Zuordnung der ^{13}C -Signale waren damals noch problematisch. Jetzt, nachdem auch geeignete Spektrometer zur Verfügung stehen, sind entsprechende Versuche mit Phomin (2) und Cytochalasin D (5) angelaufen.

4. Wahl des Mikroorganismus und Isolierung des entsprechenden Metaboliten

4.1. Metarrhizium anisopliae

Der Mikroorganismus Metarrhizium anisopliae (Metschnikoff) Sorokin ¹⁾, ICI ²⁾ Nr. 1829, IMI ³⁾ Nr. 98'373, gehört zur Klasse der Fungi imperfecti, Ordnung Moniliales, Familie Moniliaceae. Er ist weit verbreitet und wird auch anders bezeichnet. Synonyme sind: Isaria destructor Metschnikoff, Oospora destructor (Metschnikoff) Delacr., Penicillium anisopliae (Metschnikoff) Vuill. [34] [35] [36].

- 1) Wir danken an dieser Stelle Herrn Dr. W. B. Turner, ICI, Alderley Park, England, für die Ueberlassung einer Schrägagarkultur von Metarrhizium anisopliae und für die Zusendung je einer Referenzprobe von Cytochalasin C (4) und D (5).
- 2) ICI: Imperial Chemical Industries, England.
- 3) IMI: Imperial Mycological Institute, auch Commonwealth Myco-CMI: logical Institute genannt, Kew, Surrey, England.

Zur Fortpflanzung des Organismus diente ein Kartoffel-Dextrose-Nährmedium, dem Agar zugesetzt wurde [37]. Für die Produktion des Metaboliten benützte man ein Raulin-Thom-Medium (vereinfacht nach Mosseray [38]), dessen Zuckergehalt auf 2,5 % reduziert wurde. Nach einer Inkubationszeit von 14 bis 19 Tagen bei 27° wurden die Kulturen filtriert und das saure Filtrat neutralisiert. Die Extraktion mit Chloroform lieferte einen dunkelbraunen Rohextrakt, aus dem durch Säulenchromatographie an Kieselgel und anschliessendes Umkristallisieren aus Aceton/n-Hexan Cytochalasin C (4) gewonnen wurde. In der Mutterlauge kann man durch wiederholtes fraktioniertes Umkristallisieren Cytochalasin D (5) anreichern.

Nach den Angaben in der Literatur beträgt die Ausbeute an Cytochalasin C (4) 25 mg pro Liter Kulturmedium. Obwohl wir die Zuchtbedingungen variierten, gelang es uns nie, eine brauchbare Menge Cytochalasin C (4) aus unseren Kulturen zu isolieren. Stand-, Schüttel-, Rotations- und Fermenterkulturen ergaben alle das gleiche negative Ergebnis ⁴⁾. Wir versuchten, das Kulturfiltrat mit polareren Lösungsmitteln zu extrahieren (Essigester anstelle von Chloroform) und das Mycel nach intensivem Zermahlen im Mixer mit Aceton auszuziehen, blieben jedoch auch hier erfolglos. Metarrhizium anisopliae ist unter diesen Umständen für die Biosynthesebestimmung von Cytochalasin C (4) absolut unbrauchbar.

- 4) Der Fermenteransatz wurde in den mikrobiologischen Laboratorien der Firma Sandoz A.G., Basel, unter Herrn Dr. E. Härri durchgeführt. Ihm und seinen Mitarbeitern, den Herren J. Bianchi und Hofmann, sei dafür herzlich gedankt.

4.2. Zygosporium masonii

Der japanische Mikroorganismus Zygosporium masonii Hughes⁵⁾, Shionogi⁶⁾ Nr. MFC-612, ATCC⁷⁾ Nr. 20'011, wurde aus verrotten- dem Laub von Daphniphyllum macropodum isoliert, das 1965 in Kyoto gesammelt wurde. Er wurde nach Hughes [39] identifiziert und gehört wie Metarrhizium anisopliae zur Klasse der Fungi im- perfecti, Ordnung Moniliales [34].

Zur Produktion von Cytochalsin D (5) wurde der Organis- mus im Fermenter auf einem Medium aus Glucose, Pepton und Koch- salz gezüchtet. Nach einer Wachstumsperiode von 4 Tagen bei 28° wurde die Kultur filtriert und mit Methylenchlorid extra- hiert. Nach Waschen des Extrakts mit Natriumcarbonat-Lösung und Wasser und Eindampfen wurde das Rohprodukt mittels Säulen- chromatographie an Kieselgel getrennt. Nach Umkristallisieren aus Aceton/n-Hexan werden nach Literaturangaben 80 mg Cytocha- lasin D (5) pro Liter Nährmedium erhalten. Es gelang uns nicht nur, diese Ausbeuten zu erreichen, sondern später aus einem 100 Liter-Fermenteransatz⁴⁾ 26,5 g Cytochalsin D (5) zu iso- lieren, was einer Produktion von 265 mg/Liter entspricht!

Um dieses Ergebnis zu erreichen, war es vorher nötig, die Animpf- und vor allem die Aufarbeitungsmethoden zu optimieren.

5) Wir möchten an dieser Stelle Herrn Dr. Y. K. Sawa, Shionogi und Co., Osaka, Japan, für die Ueberlassung einer Schräg- agarkultur von Zygosporium masonii danken.

6) Shionogi und Co., Osaka, Japan.

7) ATCC: American Type Culture Collection, Rockville, Mary- land, U.S.A.

Zygosporium masonii wächst nicht nur im Fermenter, sondern auch in Schüttel- und Rotationskulturen. Er bildet kleine weisse Kugeln, die besonders in Rotationskulturen bei längeren Inkubationszeiten (10 - 15 Tage) einen beachtlichen Durchmesser aufweisen können (>1 cm). Auf Schrägagarkulturen bildet er weisse bis graue Höfe und lässt sich wegen des stark hydrophoben Charakters seiner Sporen praktisch nicht ablaugen. Trotz der Erniedrigung der Oberflächenspannung des Wassers durch Natrium-lauryl-sulfonat ist es nicht möglich, eine Sporensuspension herzustellen. Die Sporen müssen mit einem metallischen Schaber abgestreift werden. Damit lässt sich jedoch kein Fermenter animpfen, sodass wir dazu übergangen, den Mikroorganismus schrittweise in immer grösserer Menge hochzuziehen. Wir begannen mit einer Schrägagarkultur, deren Sporen abgestreift und auf 25 ml Nährmedium in einem 100 ml-Erlenmeyer überimpft wurden. Nach 4 Tagen Rotation bei 28° war die Kultur ausgewachsen und wurde zu 225 ml Nährmedium in einem 1 Liter-Erlenmeyer gegossen. Nach weiteren 3 Tagen Wachstumszeit wurde mit dieser neuen Kultur der Fermenter angeimpft (3,5 bis 12 Liter Ansätze).

Diese Methode bietet auf der einen Seite den Vorteil, die Anlaufperiode, bis aus den Sporen Mycel entstanden ist, in ein kleines, im Gegensatz zum Fermenter gut sterilisierbares Gefäss vorzuverlegen und verringert dadurch die Infektionsgefahr um ein Wesentliches. Auf der anderen Seite lässt sich der Fermenter jetzt nicht mehr mit konventionellen Geräten (z. B. Injektionsspritzen) animpfen, und wir mussten eine neue Impftechnik entwickeln (vgl. Exper. Teil).

Die Kulturbrühe von Zygosporium masonii weist eine schleimige, viskose Konsistenz auf und lässt sich sogar über Nylonstoffe sehr schlecht abnutschen. Wir versuchten, durch Zugabe von Aethanol den Schleim zu denaturieren und konnten damit eine merkliche Filtrationsbeschleunigung erzielen. Die optimale Alkoholzugabe liegt bei einem Aethanol/Kulturbrühe-Verhältnis von 1 : 1. Ein solch hoher Alkoholgehalt bringt auch die Zellen

des Mycels zum Platzen, sodass die nachträgliche Mycelextraktion im Mixer überflüssig wird. Der Rückstand besteht praktisch nur noch aus Zellwänden und enthält kein Antibioticum mehr.

Wir stellten ebenfalls fest, dass das Arbeiten in der Kälte (+ 2°) die Aufbereitung wesentlich erleichtert. Die zwei Faktoren, Alkohol und Kälte, ergeben zusammen eine 50-fache Zeitersparnis, wobei die Ausbeute an Antibioticum erst noch erhöht wird. Nach dieser Methode gelang es uns, bis zu 265 mg/Liter Cytochalasin D (5) zu isolieren, das in farblosen Nadeln vom Smp. 259 - 260° anfiel.

Die Wahl des Mikroorganismus und des entsprechenden Metaboliten ist damit eindeutig zugunsten von Zygosporium masonii und Cytochalasin D (5) ausgefallen. Man beachte jedoch, dass das Nährmedium aus Glucose, Pepton und Kochsalz ein ausgesprochenes Mangelmedium darstellt und den Mikroorganismus zur Produktion des Metaboliten anhalten soll. Für die Fortpflanzung des Organismus ist es höchst ungeeignet und lässt ihn nach kurzer Zeit absterben! Die Erhaltung von Zygosporium masonii geschieht am besten auf einem Kartoffel-Zucker- oder Kartoffel-Rüben-Medium bei 10°, wobei er alle 3 Monate überimpft werden sollte [24].

5. Bildungskurve von Cytochalasin D (5)

Die Erforschung der Biosynthese eines Sekundärmetaboliten erfordert die Zugabe von verschiedenen biogenetischen Vorläufern. Der geeignete Zeitpunkt für die Precursor-Zugabe wird aufgrund der Bildungskurve des Metaboliten bestimmt.

Für die Untersuchung der Bildung von Cytochalasin D (5) durch den Mikroorganismus Zygosporium masonii wurde ein 12 Liter-Fermenteransatz durchgeführt, der nach der vorhin beschriebenen Methode vorbereitet und angeimpft wurde. Der bei

28° inkubierten Kultur wurden unter sterilen Bedingungen 16 Proben zu je 500 ml entnommen. Das Zeitintervall zwischen den Probeentnahmen richtete sich nach dem sichtbaren Wachstum des Mikroorganismus. Die ersten zwei Proben wurden in 10-stündigem Abstand genommen, die nächsten sieben alle 6 Std. und die letzten sieben in immer länger werdenden Intervallen von 8 bis 72 Std. Die Proben wurden jeweils mit dem gleichen Volumen Alkohol versetzt, 2 Std. im Kühlschrank bei ca. 2° aufbewahrt, filtriert, eingengt und mit Methylenchlorid extrahiert. Der Rohextrakt wurde im Hochvakuum bei Raumtemperatur bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Die Bestimmung des Cytochalasin D (5)-Gehalts erfolgte semiquantitativ auf dünnenschichtchromatographischem Weg. Auf Kieselgelplatten erscheint Cytochalasin D (5) in J₂-Dämpfen als intensiv gefärbter Fleck, der nicht mit den anderen Komponenten des Rohextrakts überlappt. Die Sichtbarkeitsgrenze liegt bei 0,5 µg Cytochalasin D (5). In einem Konzentrationsbereich von 0,5 bis 10 µg ist Cytochalasin D (5) der markanteste Fleck des Rohextrakts. Die Cytochalasin D (5)-Menge wurde nun durch Vergleich mit einer Reihe bekannter Konzentrationen ermittelt. Die aufgetragene Menge Rohextrakt wurde konstant gehalten und mit der Testreihe verglichen. Massgebend war das gleichzeitige Erscheinen des Cytochalasin D (5)-Flecks in Rohextrakt und Test. Daraus ergab sich der Gehalt an Cytochalasin D (5) mit einer Genauigkeit von $\pm 5 \%$.

Die Genauigkeit der Methode wurde durch eine spätere quantitative Aufarbeitung der vereinigten Rohextrakte bestätigt. Die Gewichtswerte des Rohextrakts und des Cytochalasins D (5) sind in Fig. 3 wiedergegeben.

Die Bildung von Cytochalasin D (5) setzt also nach 1 1/2 Wachstumstagen des Mikroorganismus ein, steigt dann bis 3 1/2 Tage steil an und erreicht etwa nach 5 Tagen einen Endwert, der bis zum 12. Tag kaum mehr ansteigt. Der Anfangswert der Kurve

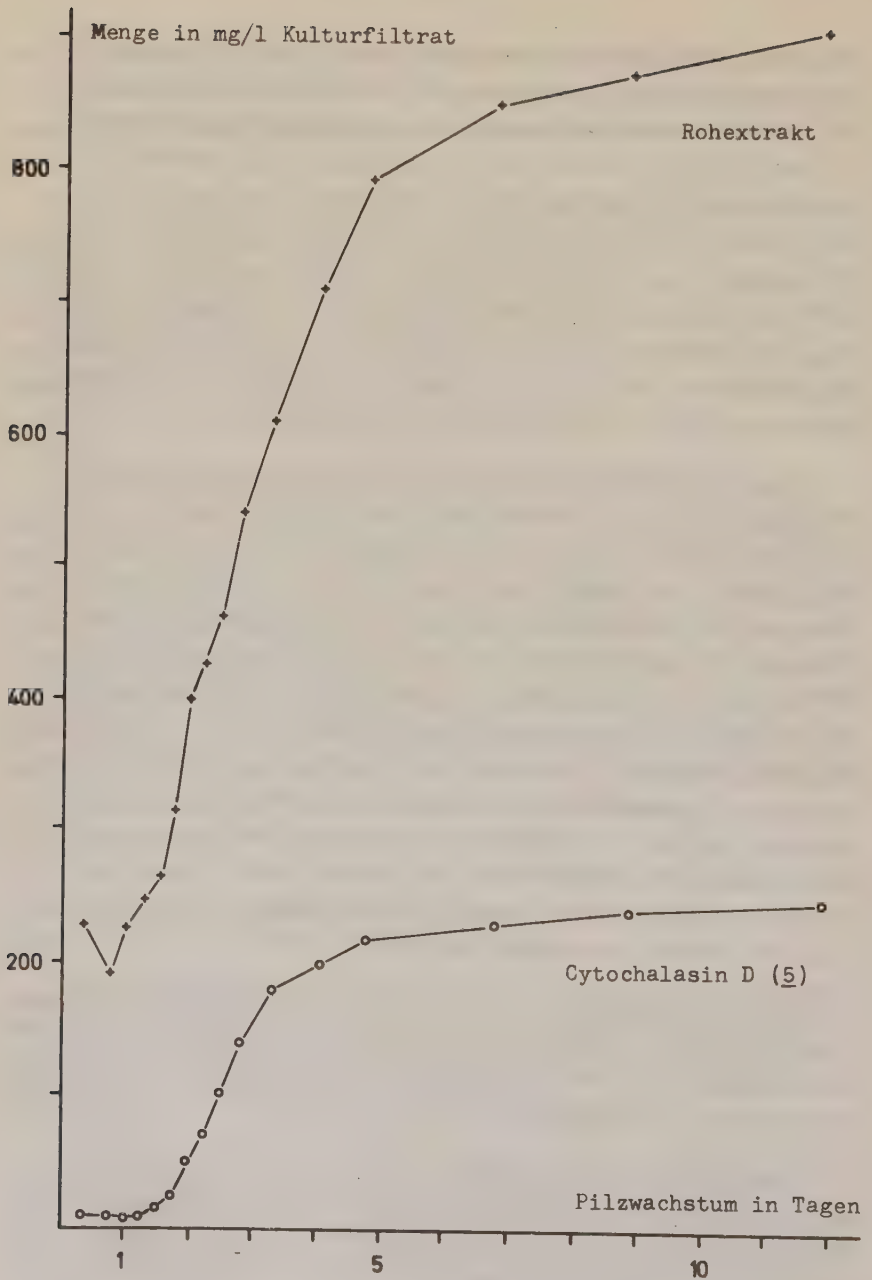


Fig. 3: Bildungskurve von Cytochalasin D (5)

(5 mg Cytochalasin D (5) pro Liter Kulturfiltrat) stammt aus den 250 ml Kulturbrühe, die zum Animpfen des Fermenters benötigt wurden.

Der geeignetste Zeitpunkt für die Zugabe der biogenetischen Vorläufer liegt unmittelbar vor Beginn der Cytochalasin D (5)-Bildung oder im unteren ansteigenden Teil der Kurve. Die Alternative dazu ist die Zugabe des Precursors vor dem Beimpfen des Ansatzes. Doch riskiert man bei dieser frühen Zugabe immer, dass der Mikroorganismus den Vorläufer zum Aufbau anderer Stoffe, insbesondere der Primärmetaboliten (z. B. Zellwände) "missbraucht" oder den Precursor zu kleineren Einheiten zerlegt und diese dann einbaut. Die Folge davon ist eine Verschmierung der Radioaktivität über die ganze Struktur des Metaboliten.

Die Zugabe des Vorläufers zu einem Zeitpunkt, an welchem sich schon Mycel gebildet hat, ist bei Fermenterkulturen - im Gegensatz zu Standkulturen - kein Problem, da der Rührer für eine homogene Verteilung sorgt. Wir entschlossen uns deshalb, jeweils den Vorläufer nach 1 1/2 bis 2 Wachstumstagen zuzugeben.

6. Biosynthese von Cytochalasin D (5)

6.1. Hypothetische Biosynthesewege

Die Grundlage für das Konzept der Biosynthese von Cytochalasin D (5) lieferten die Biosyntheseresultate von Phomin (2): Einbau von Phenylalanin einschliesslich Carboxylgruppe, von 9 Acetat-Einheiten (Nonaketid) und von 2 C₁-Einheiten aus Methionin (vgl. Fig. 2). In Anbetracht der strukturellen Ähnlichkeit von Cytochalasin D (5) mit Phomin (2) und im Hinblick auf das hypothetische Biogeneseschema der Cytochalasane (vgl. Formelschema 1), kann ein analoger Biosyntheseweg für Cytochalasin D (5) angenommen werden.

Mit grösster Wahrscheinlichkeit wird Cytochalasin D (5) aus Phenylalanin und einem Oktaketid zusammengesetzt. Die zwei C_1 -Einheiten, die in Phomin (2) aus Methionin stammen, dürften hier denselben Ursprung aufweisen. Unklar ist indessen die Herkunft der Methylgruppe an C(18). Sie kann schon im relativ frühen Stadium der Polyketidsynthese durch eine Propionat- bzw. 2-Methylmalonat-Einheit in das Oktaketid eingebaut oder erst nachträglich als C_1 -Einheit aus Methionin oder Formiat in das fertige Oktaketid eingeführt werden, wobei in Analogie zu Phomin (2) Methionin wahrscheinlicher ist.

Es kommen dementsprechend zwei Biosynthesewege in Frage (vgl. Fig. 4), die sich nur im Aufbau der Einheit C(19)-C(18)- CH_3 unterscheiden. Nach dem einen entsteht diese Einheit aus Propionat bzw. 2-Methylmalonat, nach dem anderen aus Acetat bzw. Malonat und Methionin.

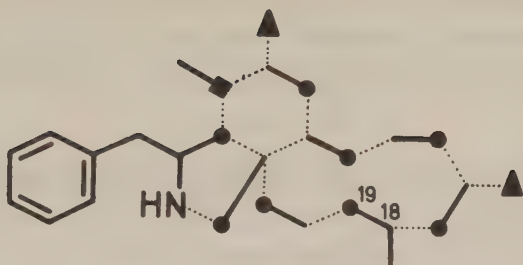
6.2. Auswahl und Verabreichung geeigneter Vorläufer

Aufgrund der dargelegten Biosynthesewege kommen für die Einbauversuche an Cytochalasin D (5) folgende Verbindungen in Frage:

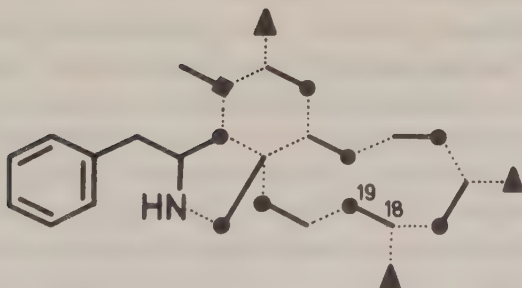
Phenylalanin
Methionin, als C_1 -Lieferant
Malonat
Acetat
2-Methylmalonat
Propionat

Durch Verabreichung von doppeltmarkiertem Phenylalanin lässt sich aus dem $^3H/^{14}C$ -Verhältnis ersehen, ob der Einbau mit oder ohne Decarboxylierung erfolgt.

Malonat und Acetat sind in Bezug auf die Kettenverlängerung äquivalent, nicht aber als Startereinheit, wofür Malonat nicht oder erst nach Decarboxylierung in Frage kommt. Das gleiche gilt für 2-Methylmalonat und Propionat. Da Propionat nach



- | | | | |
|---|-------------|---------------------------|-------|
| 1 | C_6-C_3-N | Phenylalanin | |
| 1 | C_3 | Propionat/2-Methylmalonat | ● ——— |
| 7 | C_2 | Acetat | ■ ——— |
| | | Acetat/Malonat | ● ——— |
| 2 | C_1 | Methionin | ▲ |



- | | | | |
|---|-------------|----------------|-------|
| 1 | C_6-C_3-N | Phenylalanin | |
| 8 | C_2 | Acetat | ■ ——— |
| | | Acetat/Malonat | ● ——— |
| 3 | C_1 | Methionin | ▲ |

Fig. 4: Hypothesen für die Biosynthese von Cytochalasin D (5)

den Arbeitshypothesen als Startereinheit unwahrscheinlich ist, kann hier auf die Unterscheidung Start, Kettenverlängerung verzichtet werden und nur das billigere Propionat verabreicht werden.

Diese Stoffe wurden in den folgenden radioaktiv markierten Formen verwendet:

[4'-³H][U-¹⁴C]-L-Phenylalanin
[CH₃-¹⁴C]-L-Methionin
[1-¹⁴C]-Na-Malonat
[2-¹⁴C]-Na-Malonat 8)
[1-¹⁴C]-Na-Acetat 9)
[2-¹⁴C]-Na-Acetat 9)
[2-¹⁴C]-Na-Propionat 9)

Die markierten Vorläufer wurden in Wasser gelöst und mittels einer Injektionsspritze mit vorgesetztem Sterilfilter in den Fermenter eingegeben. Normalerweise wurden sie an 6 Liter Pilzkultur verabreicht; Ausnahmen sind aus Tabelle 2 ersichtlich. Die Zucht von Zygosporium masonii verlief wie üblich, und es wurde nach Auswachsen des Mikroorganismus wie in Kapitel 4.2. beschrieben aufgearbeitet. Ueber den Zeitpunkt der Inkorporation, die Aktivität des Precursors und die erhaltene Menge Cytochalasin D (5) gibt Tabelle 2 Auskunft. Die Einbauraten der jeweiligen Ansätze gehen ebenfalls aus dieser Tabelle hervor.

Die Absolute Einbaurate errechnet sich aus der Aktivität des isolierten Cytochalasins D (5) und der Gesamtaktivität des Precursors.

8) Dieser Versuch wurde von W. Graf zur Kontrolle des Inkorporationszeitpunkts nachträglich zweimal wiederholt.

9) Diese Versuche wurden von W. Graf durchgeführt.

$$\text{Absolute Einbaurrate} = \frac{\left[\begin{array}{c} \text{Aktivität } \underline{5} \\ \text{in dpm}^{10)}/\text{mg} \end{array} \right] \cdot \left[\begin{array}{c} \text{Gesamtmenge} \\ \underline{5} \text{ in mg} \end{array} \right]}{\left[\begin{array}{c} \text{Aktivität des} \\ \text{Precursors in mC} \end{array} \right] \cdot 22,2 \cdot 10^8 \quad 11)}$$

Die Spezifische Einbaurrate ist der Quotient aus der Aktivität des isolierten Cytochalasins D (5) in mC/mMol und der Aktivität des Precursors in mC/mMol.

$$\text{Spezifische Einbaurrate} = \frac{\left[\begin{array}{c} \text{Aktivität } \underline{5} \\ \text{in dpm/mg} \end{array} \right] \cdot \left[\begin{array}{c} \text{Molgewicht } \underline{5} \end{array} \right]}{\left[\begin{array}{c} \text{Aktivität des Pre-} \\ \text{cursors in mC/mMol} \end{array} \right] \cdot 22,2 \cdot 10^8}$$

Ausser Na-Malonat wurden alle verwendeten Vorläufer mit brauchbaren bis guten Einbauzeiten eingebaut. Sehr hohe Einbauzeiten ergaben die Versuche mit Phenylalanin und Methionin.

In den ersten Versuchen mit Na-Malonat wurde der Vorläufer relativ spät zu den Pilzkulturen gegeben, sodass die Vermutung aufkam, hier könne der Grund des geringen Einbaus liegen. Mit den weiteren, früher inkorporierten Ansätzen von $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ -Na-Malonat konnte die absolute Einbaurrate verfünffacht werden (Sie bleibt aber dennoch im Vergleich zur Acetateinbaurrate recht klein). An dieser Stelle soll daran erinnert werden, dass unspezifische Vorläufer wie Malonat, Acetat und Propionat mit Vorteil zu Beginn des Pilzwachstums verabreicht werden.

10) dpm: decomposition per minute = Zerfälle pro Minute

11) 1 mC = $22,2 \cdot 10^8$ Zerfälle pro Minute

Tabelle 2: Daten der biogenetischen Vorläufer und des aus den jeweiligen Kulturanisätzen gewonnenen Cytochalasins D (5)

Biogenetischer Vorläufer				Kulturanisatz in %	Cytochalasin D (5)			(Mol.-Gew. 507)	
Bezeichnung	Inkorp. Zeitp. in Std.	Aktivität gesamte in mC	Aktivität spez. in mC/mM		Menge in mg	Aktivität in dpm/mg	Aktivität in dpm/mM	Abs. Einbaurate in %	Spez. Einbaurate in %
[4- ³ H][U- ¹⁴ C]-L-Phenylalanin	30	³ H: 1,0 ¹⁴ C: 0,1	21'000 475	6	940	315'300 33'390	1600 · 10 ⁵ 169,5 · 10 ⁵	13,35 14,15	3,43 · 10 ⁻⁴ 16,1 · 10 ⁻⁴
[CH ₂ - ¹⁴ C]-L-Methionin	30	0,1	60	6	690	52'200	264 · 10 ⁵	16,2	198 · 10 ⁻⁴
[1- ¹⁴ C]-Na-Malonat	38	0,1	14,5	6	540	515	2,61 · 10 ⁵	0,125	8,11 · 10 ⁻⁴
[2- ¹⁴ C]-Na-Malonat	45	0,1	18,5	6	490	235	1,19 · 10 ⁵	0,052	2,90 · 10 ⁻⁴
	15	0,05	10,3	6	300	521	2,64 · 10 ⁵	0,141	11,5 · 10 ⁻⁴
	0	0,05	10,3	6	1010	268	1,36 · 10 ⁵	0,244	5,95 · 10 ⁻⁴
[1- ¹⁴ C]-Na-Acetat	0	0,25	58	3,5	630	22'700	115 · 10 ⁵	2,58	89,3 · 10 ⁻⁴
[2- ¹⁴ C]-Na-Acetat	0	0,5	60	6	1030	12'100	61,3 · 10 ⁵	1,12	46,0 · 10 ⁻⁴
[2- ¹⁴ C]-Na-Propionat	0	0,25	15,6	3,5	50	35'400	179 · 10 ⁵	0,319	518 · 10 ⁻⁴

6.3. Chemischer Abbau von Cytochalasin D (5)

6.3.1. Allgemeines

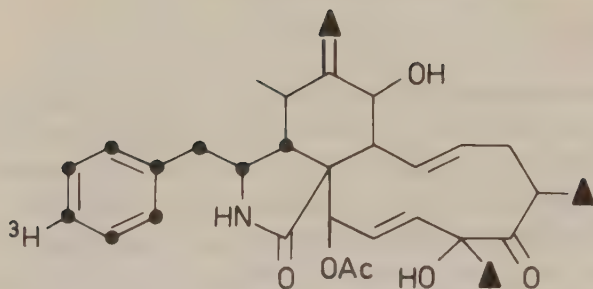
Aus den Inkorporationsversuchen lagen nun eine Reihe von Cytochalasin D (5)-Mustern vor, in denen die Verteilung der Radioaktivität bestimmt werden sollte. Wegen des zu erwartenden grossen Zeitaufwands für die Bestimmung der Radioaktivitätsverteilung in allen markierten Verbindungen beschränkt sich diese Arbeit auf den chemischen Abbau der mit Phenylalanin und mit Methionin inkorporierten Cytochalasin D (5) -Proben.

Diese bevorzugte Behandlung verdanken die Phenylalanin- und Methionin-markierten Verbindungen vorerst ihrer hohen Aktivität. Es kam auch zur Geltung, dass das Phenylalanin-Muster wegen der relativ kurzen Halbwertszeit von ^3H (12,26 Jahre) bald abgebaut werden musste und dass das Resultat des Abbaus des Methionin-Musters eine Entscheidung zwischen den oben erwähnten beiden Hypothesen der Biosynthese des Cytochalasins D (5) ermöglicht.

In Fig. 5 sind die vermutlichen Radioaktivitätszentren in Cytochalasin D (5) nach Inkorporation von Phenylalanin und Methionin dargestellt.

Bevor jedoch an einen Abbau der radioaktiven Cytochalasin D (5)-Präparate gedacht werden konnte, mussten die Abbaureaktionen anhand von inaktivem Cytochalasin D (5) ausgearbeitet werden. Es galt, eine möglichst grosse Zahl der als aktiv vermuteten C-Atome einzeln oder in Gruppen aus dem Gerüst herauszuschälen und als Derivate in eine zur Bestimmung der Radioaktivität geeignete Form zu bringen, wobei die Reaktionen eindeutig verlaufen und gute Ausbeuten liefern sollten.

Der in diesem Kapitel in allgemeiner Form dargestellte Abbau von Cytochalasin D (5) wurde speziell im Hinblick auf die anspruchsvollere Bestimmung der Methioninaktivität ausge-



● ^{14}C aus Phenylalanin; ^3H aus Phenylalanin
 ▲ ^{14}C aus Methionin

Fig. 5

arbeitet. Alle Abbauprobungen mit radioaktivem Material erfolgten in derselben Weise und werden deshalb nicht im Einzelnen beschrieben. Modifikationen, wie z. B. Verdünnen des radioaktiven Materials, werden jeweils bei den Resultaten der Abbauprobungen erwähnt. Für die Numerierung der C-Atome in den Abbauprodukten werden der Uebersichtlichkeit halber die Ziffern des Cytochalasins D (5) beibehalten.

6.3.2. Abbausequenz 1 (vgl. Formelschema 2)

Cytochalasin D (5) wurde zunächst katalytisch mit H_2/Pt in Eisessig reduziert. Daraus resultierten nach Trennung auf Kieselgel die zwei an C(6) epimeren Dodecahydrocytochalasine D 16a und 16b, deren spektrale Daten und Schmelzpunkte mit den Literaturangaben [8] übereinstimmten. Untereinander zeigen die Isomeren gleiche IR.-, UV.- und Massenspektren und ebenfalls dieselbe optische Drehung; sie unterscheiden sich jedoch im chromatographischen Verhalten, im Schmelzpunkt und im NMR.-Spektrum.

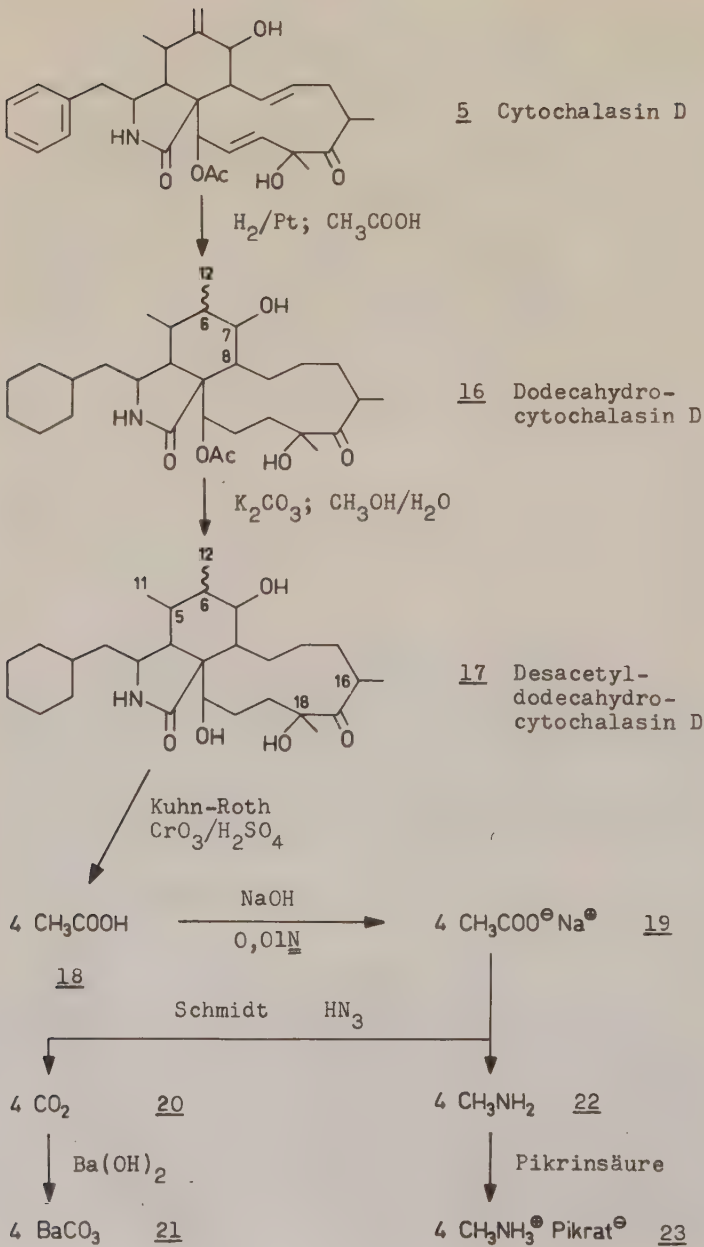
Die eindeutige Zuordnung der Konfiguration, die bisher nicht vorgenommen worden war, wurde anhand des NMR.-Spektrums versucht. Betrachtungen am Dreiding-Modell zeigen, dass die durch die verschiedenen Diederwinkel verursachten Kopplungskonstanten $J_{6,7}$ und $J_{7,8}$ im einen Isomeren 10 Hz betragen, im anderen 7 Hz. Die Frage, ob dieser geringe Unterschied wirklich ersichtlich und beweiskräftig ist, bleibt offen; denn das Proton an C(7) konnte im Spektrum nicht eindeutig zugeordnet werden. Dazu wäre es nötig, die Isomeren 16a und 16b in 7-Stellung zu acetylieren und die NMR.-Daten der acetylierten und nicht-acetylierten Verbindungen zu vergleichen. Das Proton an C(7) müsste in den acetylierten Verbindungen um ca. 1 ppm nach tieferem Feld verschoben werden und würde dadurch identifizierbar.

Da aber die weiteren Reaktionen eine Trennung der isomeren Dodecahydrocytochalasine D 16a und 16b nicht erforderten, verzichteten wir auf die Bestimmung der Konfiguration der beiden Epimeren.

Die Hydrolyse des Epimerengemisches 16a und 16b mit K_2CO_3 in wässrigem Methanol bei Raumtemperatur ergab die entsprechenden zwei Desacetyldodecahydrocytochalsin D-Isomeren 17a und 17b, die nicht getrennt wurden. Ihre Identifizierung erfolgte aufgrund der fehlenden Acetatbanden im IR.-Spektrum und aufgrund des Massenspektrums, welches die erwartete Masse des Molekel-Ions zeigte und keine der charakteristischen Abspaltungen von Acetaten aufwies.

CrO_3 -Oxidation von Desacetyldodecahydrocytochalsin D (17) im Bombenrohr im Schüttelautoklaven bei 130 - 140° nach Kuhn-Roth [40] [41] [42] lieferte in etwa 80 % Ausbeute 4 Äquivalente Essigsäure (18), die aus den C-Atomen Nr. 5, 6, 11, 12, 16, 18 und den Methylgruppen an C(16) und C(18) stammen. Die Essigsäure (18) wurde titriert und als Na-Acetat (19) isoliert. Der Schmidt-Abbau des Na-Acetats (19) mit NaN_3 in Polyphosphor-

Formelschema 2



säure [43] [44] lieferte die C-Atome Nr. 5, 6, 16, 18 als CO_2 (20), das als BaCO_3 (21) isoliert wurde, und die C-Atome Nr. 11, 12 und die Methylgruppen an C(16) und C(18) als Methylamin (22), das als Pikrat (23) gefasst wurde.

6.3.3. Abbausequenz 2 (vgl. Formelschema 3)

Cytochalasin D (5) wurde mit K_2CO_3 in wässrigem Methanol bei Raumtemperatur zu Desacetylcytochalasin D (24) hydrolysiert, dessen Schmelzpunkt und spektrale Daten mit den Literaturangaben [8] übereinstimmten.

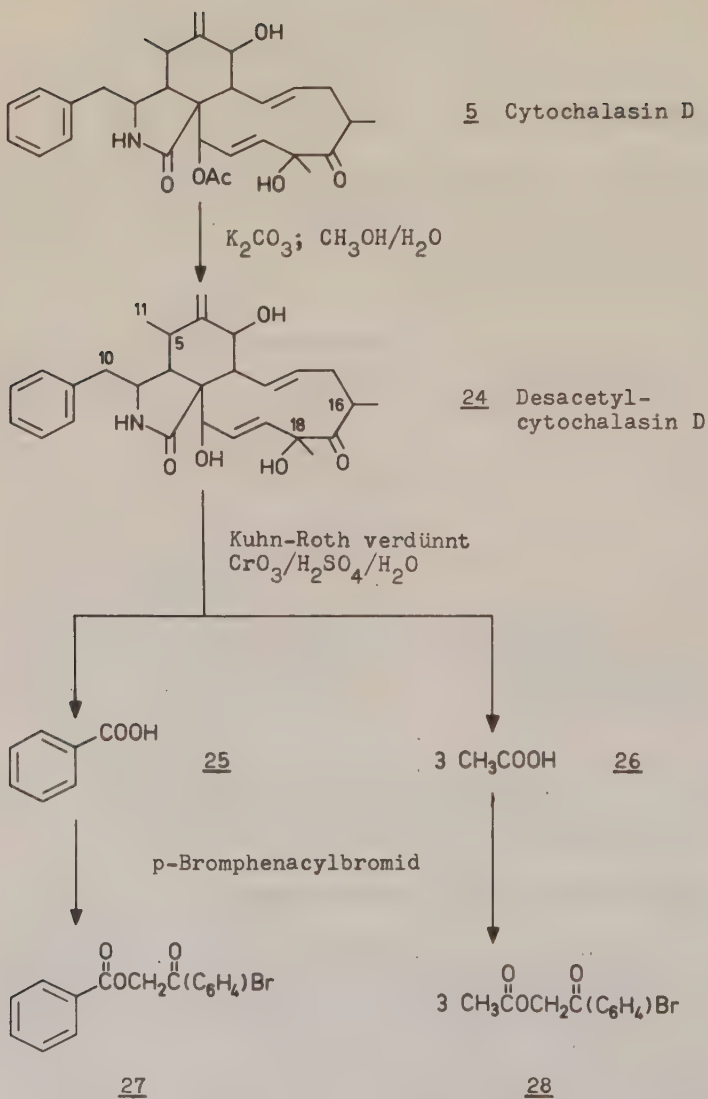
Kuhn-Roth-Oxidation von Desacetylcytochalasin D (24) lieferte in kleiner Menge auch Benzoesäure neben Essigsäure. Zur Verbesserung der Benzoesäureausbeute wurden die Reaktionen unter den von Kiechel et al. [31] ausgearbeiteten Bedingungen durchgeführt: Die Oxidationslösung wurde mit Wasser verdünnt und nur während 1 Std. auf 130° erwärmt. Auf diese Weise erhielten wir in 73 % Ausbeute ein Säuregemisch aus 1 Äquivalent Benzoesäure (25), die von der Phenyl-C(10)-Gruppierung stammt, und 3 Äquivalenten Essigsäure (26), die aus den C-Atomen Nr. 5, 11, 16, 18 und den Methylgruppen an C(16) und C(18) entstehen.

Die beiden Säuren 25 und 26 wurden über ihre Natriumsalze in die p-Bromphenacylester 27 resp. 28 verwandelt, die durch Chromatographie an Kieselgel getrennt wurden.

6.3.4. Abbausequenz 3 (vgl. Formelschema 4)

In Anlehnung an den ozonolytischen Abbau von Phomin (2), der sich bei der Aufklärung der Struktur [2] und Biosynthese [31] dieses Metaboliten als sehr nützlich erwiesen hatte, wurde Cytochalasin D (5) in Methanol bei -75° mit Ozon im Ueberschuss (150 - 180 %, bis zur deutlichen Blaufärbung der Lösung) behandelt. Die reduktive Spaltung der Ozonide mit NaBH_4 lieferte drei Alkohole: ein Pentahydroxy- γ -lactam, 2,4-

Formelschema 3



-Dimethyl-hexan-1,2,3,6-tetrol, kurz "Hexantetrol", und Methanol, das jedoch im Lösungsmittel verloren geht.

Die Ozonolysen-Lösung wurde sauer gestellt und im Kutscher-Steudel-Apparat 8 - 10 Tage mit Methylenchlorid extrahiert. Das anfallende Gemisch der Bruchstücke wurde anschließend mit Acetanhydrid in Pyridin acetyliert und säulenchromatographisch auf Kieselgel getrennt. Es resultierten fünf Verbindungen: zwei Derivate des Pentahydroxy- γ -lactams (ein Penta-O-acetyl- γ -lactam 29 und ein N-Acetyl-penta-O-acetyl- γ -lactam 30) und drei Derivate des Hexantetrols (die 1,6-Di-O-acetyl-Verbindung 31, die 1,3,6-Tri-O-acetyl-Verbindung 32 und die 1,2,3,6-Tetra-O-acetyl-Verbindung 33).

Die Reinigung der Reaktionsprodukte erfolgte mittels präparativer Dünnschichtchromatographie. Die Ausbeuten der Reaktionen bezogen auf Cytochalasin D (5) lagen für das Gemisch der γ -Lactame 29 und 30 bei 60 %, für das Gemisch der acetylierten Hexantetrole 31, 32 und 33 etwas höher bei 70 %.

Die Struktur des Penta-O-acetyl- γ -lactams 29 (amorpher Festkörper) ergab sich aus den spektralen Daten. Das IR.-Spektrum von 29 (in CHCl_3) zeigt an typischen Absorptionen die NH-Schwingungen bei $3600 - 3200 \text{ cm}^{-1}$ (assoz.) und bei 3420 cm^{-1} (frei), die Carbonylbanden von Acetat (1740 cm^{-1}) und γ -Lactam (1705 cm^{-1}), den Aromaten bei 3050 , 1610 und 1500 cm^{-1} und die Esterbande bei 1240 cm^{-1} . Im Massenspektrum von 29 tritt das Molekel-Ion bei m/e 575, entsprechend der Summenformel $\text{C}_{29}\text{H}_{37}\text{NO}_{11}$, auf. Ferner sind die charakteristischen Abspaltungen von CH_3CO , CH_3COO , C_7H_7 , und die daraus resultierenden Sequenzen zu erkennen. Basissignal ist das Tropylium-Ion bei m/e 91.

Aus dem 100-MHz-NMR.-Spektrum von 29 (in CDCl_3) ging hervor, dass die Verbindung als Epimerengemisch bezüglich der an C(6) neu eingeführten Acetoxygruppe vorliegt. Das Signal der

11-Methylgruppe erscheint nämlich zweimal als Dublett. Aus dem Integral lässt sich ein Verhältnis der Epimeren von etwa 3 : 2 abschätzen. Das Spektrum zeigt bei $\delta = 7,3$ ppm ein Multiplett, das den 5 aromatischen Protonen entspricht. Das Signal bei $\delta = 5,9$ ppm stammt vom Proton der NH-Gruppierung, denn es tauscht mit D_2O aus. Es folgt bei $\delta = 4,3$ ppm ein AB-System, das den zwei Protonen an C(13) zuzuordnen ist ($J_{gem} = -12$ Hz, $J_{8,13} = 16$ Hz). Die 15 Acetylprotonen treten bei $\delta = 2,1$ ppm als Multiplett auf, und die Protonen der 11-Methylgruppe bilden wie schon erwähnt, ein Dublett mit der Kopplungskonstante $J_{5,11} = 7$ Hz, das bei $\delta = 1,2$ ppm (Integral 1,2 H) und bei $\delta = 1,04$ ppm (Integral 1,8 H) auftritt.

Das N-Acetyl-penta-O-acetyl- γ -lactam 30, ein farbloses Öl, trägt im Vergleich mit 29 am Stickstoff eine weitere Acetylgruppe. Entsprechend fehlen im IR.-Spektrum von 30 (in $CHCl_3$) die NH-Schwingungen bei $3600 - 3200\text{ cm}^{-1}$ und bei 3420 cm^{-1} , und die γ -Lactambande wird etwas zu grösseren Wellenzahlen verschoben (1710 cm^{-1}). Die Aromatbanden (3050 , 1610 und 1500 cm^{-1}), sowie die Acetatsignale (1740 und 1240 cm^{-1}) sind unverändert vorhanden. Im Massenspektrum von 30 tritt das Molekel-Ion, entsprechend der Summenformel $C_{31}H_{39}NO_{12}$, bei m/e 617 auf. Die charakteristischen Abspaltungen von CH_3CO , CH_3COO , C_7H_7 und die daraus resultierenden Sequenzen sind ebenfalls zu erkennen. Basissignal ist das Tropylium-Ion bei m/e 91. Das NMR.-Spektrum von 30 (in $CDCl_3$) zeigt kein mit D_2O austauschbares Proton mehr (NH) und das Integral des Acetylmultipletts bei $\delta = 2,1$ ppm weist 18 Protonen auf. Aus dem Signal der 11-Methylgruppe geht hervor, dass 30 wie 29 ein Epimerengemisch bezüglich der an C(6) neu eingeführten Acetoxygruppe darstellt.

Die chemische Verknüpfung von 29 mit 30 gelang durch Acetylieren von 29 mit Acetanhydrid in Pyridin bei 60° während zwei Tagen. Dabei entstand ein Gemisch von 29 und 30.

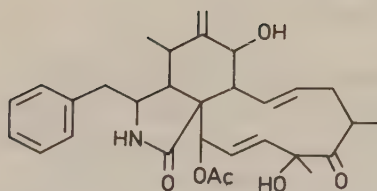
Die acetylierten Hexantetrole 31, 32 und 33 mussten durch eine Hochvakuumdestillation im Kugelrohr gereinigt werden. Alle drei Stoffe sind farblose Oele.

Im IR.-Spektrum von 1,6-Diacetoxy-2,4-dimethyl-hexan-2,3-diol (31) (in CHCl_3) erscheinen die assoziierte OH-Schwingung bei $3600 - 3200 \text{ cm}^{-1}$, die intensiven CH-Banden bei 2970 , 2940 , 2890 und 2850 cm^{-1} und die Acetatbanden bei 1730 und 1240 cm^{-1} . Der Summenformel $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_6$ gemäss finden wir im Massenspektrum von 31 das Molekel-Ion bei m/e 262. Es ist in der Intensität sehr schwach, ebenso die Abspaltungen von H_2O , zweimal H_2O und CH_3COOH , die zu den Fragment-Ionen m/e 244, 226 bzw. 202 führen. Basissignal ist das Fragment-Ion m/e 142, das der Abspaltung von 2 Äquivalenten CH_3COOH entspricht.

Das NMR.-Spektrum von 31 (in CDCl_3) zeigt bei $\delta = 4,2$ ppm ein AB-System, welches den Methylenprotonen an C(19) entspricht ($J_{\text{gem}} = -12 \text{ Hz}$). Darauf folgt bei $\delta = 4,0$ ppm das Dublett des Methinprotons an C(17) ($J_{16,17} = 5 \text{ Hz}$). Unter diesen zwei Signalen liegt das Triplet der Methylenprotonen an C(14) ($J_{14,15} = 6 \text{ Hz}$). Bei $\delta = 2,1$ ppm folgen die 6 Acetylprotonen als Doppelsignal, bei $\delta = 1,3$ ppm das Singulett der Methylgruppe an C(18) und bei $\delta = 1,1$ ppm das Dublett ($J = 7 \text{ Hz}$) der Methylgruppe an C(16). Zwischen $\delta = 1,5$ ppm und $\delta = 2,0$ ppm erscheinen als breites Multiplett die Protonen an C(15) und C(16). Die beiden mit D_2O austauschbaren Protonen der OH-Gruppen treten bei $\delta = 2,8$ ppm und $\delta = 2,1$ ppm auf.

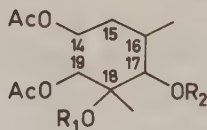
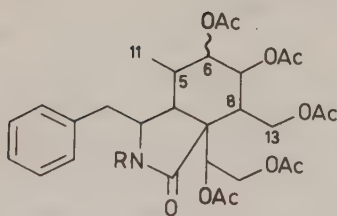
1,3,6-Triacetoxy-2,4-dimethyl-hexan-2-ol (32) zeigt im IR.-Spektrum (in CHCl_3) eine schwächere OH-Bande (assoz.) bei $3600 - 3300 \text{ cm}^{-1}$ als 31, im übrigen sind die Spektren gleich. Im Massenspektrum von 32 tritt das erwartete Molekel-Ion bei m/e 304 ($\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{O}_7$) nicht auf. Dafür sind die Abspaltungen von H_2O (m/e 286), CH_3COO (m/e 245), CH_3COO und CH_3COOH (m/e 185) und den daraus resultierenden Sequenzen in guter Intensität vertreten. Die Basissignale bilden die Fragment-Ionen m/e 286

Formelschema 4



5 Cytochalasin D

1. O_3 ; CH_3OH
2. $NaBH_4$
3. Ac_2O/Py



29 $R = H$

30 $R = Ac$

31 $R_1 = H$, $R_2 = H$

32 $R_1 = H$, $R_2 = Ac$

33 $R_1 = Ac$, $R_2 = Ac$

(Abspaltung von H_2O) und m/e 125 (Abspaltung von CH_3COO und $2 CH_3COOH$), die beide dieselbe Intensität besitzen.

Im IR.-Spektrum von 1,2,3,6-Tetraacetoxy-2,4-dimethylhexan (33) (in CCl_4) fällt die OH-Schwingung oberhalb 3000

cm^{-1} gänzlich weg. Das übrige Spektrum ist identisch mit den Spektren von 31 und 32. Im Massenspektrum von 33 ist das Molekel-Ion bei m/e 346 ($\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{O}_8$) nicht sichtbar. Das erste erkennbare Fragment-Ion liegt bei m/e 174; es ist das Resultat der Abspaltung von 4 CH_3CO -Gruppen. Das Basissignal ist ein kleineres Fragment-Ion bei m/e 85.

Die drei Verbindungen 31, 32 und 33 wurden chemisch miteinander verknüpft durch Acetylieren mit Acetanhydrid in Pyridin bei 60° während zwei Tagen. Aus dem Diacetat 31 wie auch aus dem Triacetat 32 entstand ein Gemisch von Tri- und Tetraacetat 32 bzw. 33.

Diese Abbausequenz trennt die 11-Methylgruppe von den Methylgruppen an C(16) und C(18). Befindet sich die Radioaktivität ausschliesslich in den Methylgruppen, so erübrigt sich der weitere Abbau von 29, 30 und von 31, 32, 33. Andernfalls müssen zunächst alle Acetoxygruppen basisch hydrolysiert und im Falle von 29, 30 der Benzolring hydriert werden. Darauf folgen ein Kuhn-Roth- und anschliessend ein Schmidt-Abbau. Auf diese Weise können einerseits aus 29, 30 das C-Atom Nr. 5 und aus 31, 32, 33 die C-Atome Nr. 16, 18 als BaCO_3 gewonnen werden; andererseits werden aus 29, 30 das C-Atom Nr. 11 und aus 31, 32, 33 die Methylgruppen an C(16) und C(18) als Methylaminpikrat erfasst.

6.3.5. Abbausequenz 4 (vgl. Formelschema 5)

Eine weitere Möglichkeit zur Trennung der Methylgruppen bietet die drastische Hydrolyse von Cytochalasin D (5) nach Minato et al. [8].

Cytochalasin D (5) wurde mit K_2CO_3 in wässrigem Methanol während vier Tagen unter Stickstoffatmosphäre unter Rückfluss erwärmt. Dabei entstanden ein Neutralkörper (vermutlich Lävulinaldehyd (34)) und ein Gemisch von zwei isomeren Säuren, das mit Diazomethan in das entsprechende Gemisch der zwei iso-

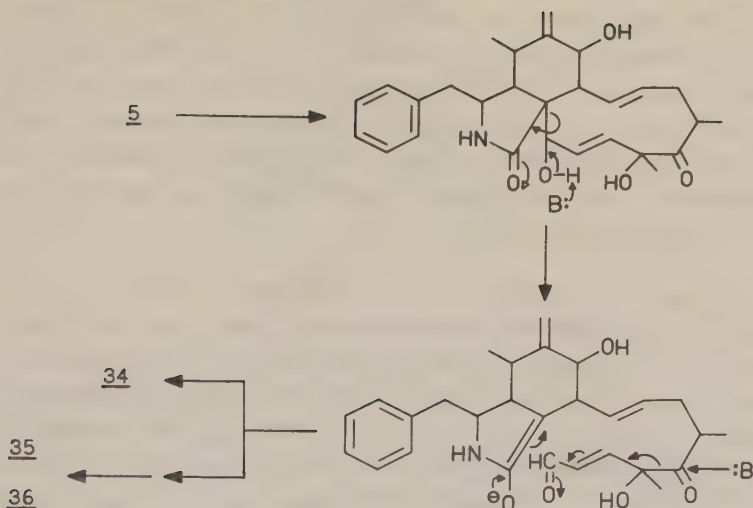
meren Methylester 35 und 36 übergeführt wurde. Wie auch Minato et al. [8], gelang es uns nie, den Lävulininaldehyd (34) zu isolieren, obwohl wir versuchten, ihn als Derivat, z. B. als 2,4-Dinitrophenylhydrazon, direkt in der Reaktionslösung zu erfassen. Er scheint sich wegen seiner Empfindlichkeit unter den benutzten Reaktionsbedingungen zu zersetzen.

Das Gemisch der isomeren Methylester liess sich durch Säulenchromatographie an Kieselgel trennen. Die Produkte wurden anschliessend mittels präparativer Dünnschichtchromatographie gereinigt. Sie stimmen in den IR.-, NMR.- und Massenspektren mit den Literaturangaben [8] überein.

Der strukturelle Unterschied der Isomeren liegt in der Ringverknüpfung an C(9), die in 35 cis-ständig und in 36 trans-ständig ist. Demnach wird das C-Atom Nr. 9 in die Hydrolysenreaktion miteinbezogen, vermutlich nach folgendem von Minato et al. [8] formulierten Mechanismus:

Cytochalasin D (5) wird zunächst zu Desacetylcytochalasin D (24) hydrolysiert, welches dann durch eine Art Retroaldol-Reaktion zwischen C(9) und C(21) gespalten wird. Die dabei entstehende Enolform im Fünfring erlaubt die Isomerisierung an C(9). Hierauf werden durch den Angriff der Base an C(17) — es handelt sich um ein vinyloges 1,3-Dicarbonylsystem — Lävulin-aldehyd (34) freigesetzt und die isomeren Säuren gebildet (vgl. Formelschema).

Das Verhältnis der Isomeren beträgt etwa 2 : 1. Die Hauptkomponente ist ein krist. Stoff, der aus Aether in farblosen Nadeln vom Smp. 108 - 110° anfällt; er besitzt die Konstitution 35. Das in kleinerer Menge vorkommende Isomere ist ein farbloses Öl; wir ordnen ihm die Struktur 36 zu. 35 und 36 besitzen identische Massenspektren, sie unterscheiden sich jedoch in den IR.- und NMR.-Spektren, im optischen Drehwert, im Schmelzpunkt und im chromatographischen Verhalten.



Die hier verwendete Zuordnung der Strukturen von 35 und 36 ist nicht der Literatur [8] zu entnehmen. Sie stützt sich auf den Vergleich mit Cytochalasin D (5), die Betrachtung der Gleichgewichtslage bei der Isomerisierung und die Interpretation der IR.- und NMR.-Spektren.

Die Stereochemie und die absolute Konfiguration von Cytochalasin D (5) sind bekannt. Durch die Röntgen-Strukturanalyse [10] [11] wurde bewiesen, dass der fünf- und der sechsgliedrige Ring im Isoindolonteil von Cytochalasin D (5) cis-ständig verknüpft sind. Es ist anzunehmen, dass die cis-Verknüpfung der Ringe, die auch in Phomin (2) [5] und in Cytochalasin E (10) [15] durch Röntgen-Strukturanalyse nachgewiesen wurde, in Analogie zu α -Hydrindanon [45] die thermodynamisch stabilere Form darstellt.

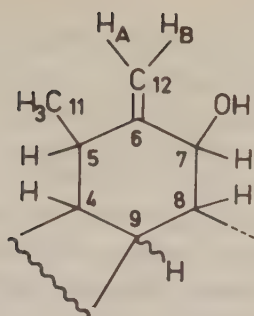
Die Isomeren 35 und 36 entstehen bei der viertägigen basischen Hydrolyse von 5 im Verhältnis 2 : 1. Minato et al. [8] ver-

suchten, das in kleinerer Menge vorhandene Isomere 36 unter denselben Bedingungen zu isomerisieren. Nach 7 Std. fanden sie ein Isomerenverhältnis von etwa 1 : 1. 36 lässt sich also isomerisieren und würde wahrscheinlich die Isomeren ebenfalls im Verhältnis 2 : 1 bilden, wenn die Reaktion bis zur Einstellung des Gleichgewichtes durchgeführt würde. 35 ist das thermodynamisch stabilere Isomere, und es liegt nun nahe, ihm die cis-Verknüpfung zuzuordnen.

In den IR.-Spektren von 5, 35 und 36 (in CCl_4) ist die Lage der γ -Lactambande aufschlussreich, denn sie stellt ein Mass für die Spannung innerhalb des Fünfrings dar. Man vergleiche dazu die üblichen Lagen der Lactambanden je nach Ringgrösse: bei Sechs- und grösseren Ringen liegt sie um 1670 cm^{-1} , bei Fünfringen um 1700 cm^{-1} und bei Vierringen um 1745 cm^{-1} . Im IR.-Spektrum von 5 und von 35 finden wir die γ -Lactambande bei 1690 cm^{-1} . Das IR.-Spektrum von 36 zeigt sie jedoch bei 1710 cm^{-1} , d.h. 20 cm^{-1} höher. Diese Verschiebung ist ein Zeichen für die durch die trans-Verknüpfung verursachte grössere Spannung im Fünfring von 36, was auch aus dem Vergleich der Modelle von 35 und 36 sofort ersichtlich wird. Obwohl wir die für den Fünfring speziell berechneten Bauelemente des Dreiding-Modells benutzten, die uns richtige Bindungslängen und -winkel gewährleisten, liess sich das trans-verknüpfte Isoindolon-System nur mit Mühe aufbauen.

Die Aussage des IR.-Spektrums steht also mit dem Resultat der Hydrolysenreaktion im Einklang; denn die Spannung im Fünfring des trans-verknüpften Isomeren bewirkt ja sowohl die Verschiebung der γ -Lactambande nach höherer Wellenzahl als auch die geringere thermodynamische Stabilität.

Zur Interpretation der NMR.-Spektren von 5, 35 und 36 (in CDCl_3) ist vorerst das Erfassen der Kopplungsverhältnisse innerhalb des Sechsrings im Isoindolon-Teil nötig. Das Proton



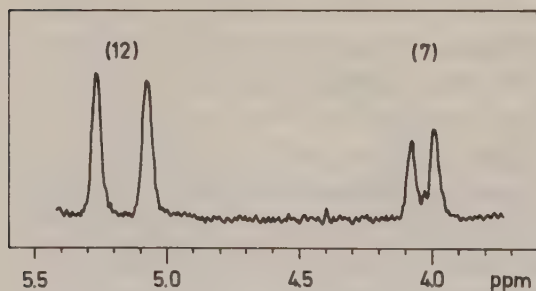
an C(5) koppelt mit dem Proton an C(4), mit den Protonen der 11-Methylgruppe und allylisch mit den Protonen an C(12). Es liegt als Multiplett unter den übrigen Methin- und Methylenprotonen des Moleküls verborgen. Das Proton an C(7) wird vom Proton an C(8) zu einem Dublett aufgespalten, das durch die Allylkopplungen mit den Protonen an C(12) weitergespalten wird. Es liegt gut erkenntlich bei $\delta \sim 4$ ppm. Die Protonen an C(12) sind nicht äquivalent und koppeln ausserdem nicht miteinander, sodass sie als zwei getrennte Signale bei $\delta \sim 5$ ppm erscheinen, die durch Allylkopplungen mit den Protonen an C(5) und C(7) aufgespalten werden. Die genauen chemischen Verschiebungen und die Kopplungskonstanten gehen aus Tabelle 3 hervor:

Tabelle 3: NMR.-Daten von 5, 35 und 36 (in CDCl_3 gemessen)

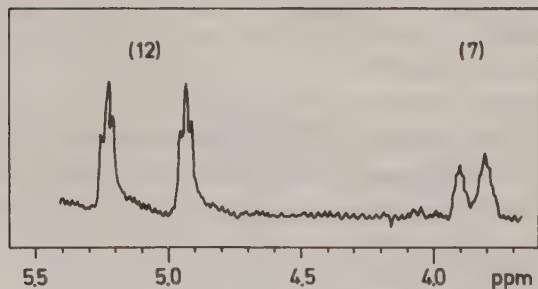
Verbindung	H an C(7)	H an C(12)	
<u>5</u>	3,80 d, J = 10	5,27 s	5,07 s
<u>35</u>	4,03 d, J = 9	5,27 s	5,08 s
<u>36</u>	3,86 dt, J = 9 J = 2	4,94 t, J = 2	5,23 t, J = 2

δ -Werte in ppm, J in Hz, s = Singulett, d = Dublett, t = Triplet.

Die Aehnlichkeit der NMR.-Daten von 5 mit 35 im Gegensatz zu 36 ist frappant. Die Allylkopplungen der Protonen an C(12) mit den Protonen an C(5) und C(7) sind in 5 und 35 nicht signifikant ($J < 0,5$ Hz) und bewirken keine Aufspaltung der Signale, sondern nur eine Verbreiterung. In 36 hingegen sind die Allylkopplungen ausgeprägt vorhanden. Da die Kopplungskonstanten $J_{5,A}$, $J_{5,B}$, $J_{7,A}$ und $J_{7,B}$ alle einen Wert um 2 Hz aufweisen, werden die Signale zu Triplets aufgespalten (vgl. Fig. 6). Diese Befunde weisen wiederum darauf hin, dass 35 dieselbe Konfiguration wie 5 besitzt und 36 die umgekehrte.



35 in CDCl_3
100 MHz



36 in CDCl_3
100 MHz

Fig. 6: NMR.-Spektren von 35 und 36 (Ausschnitte)

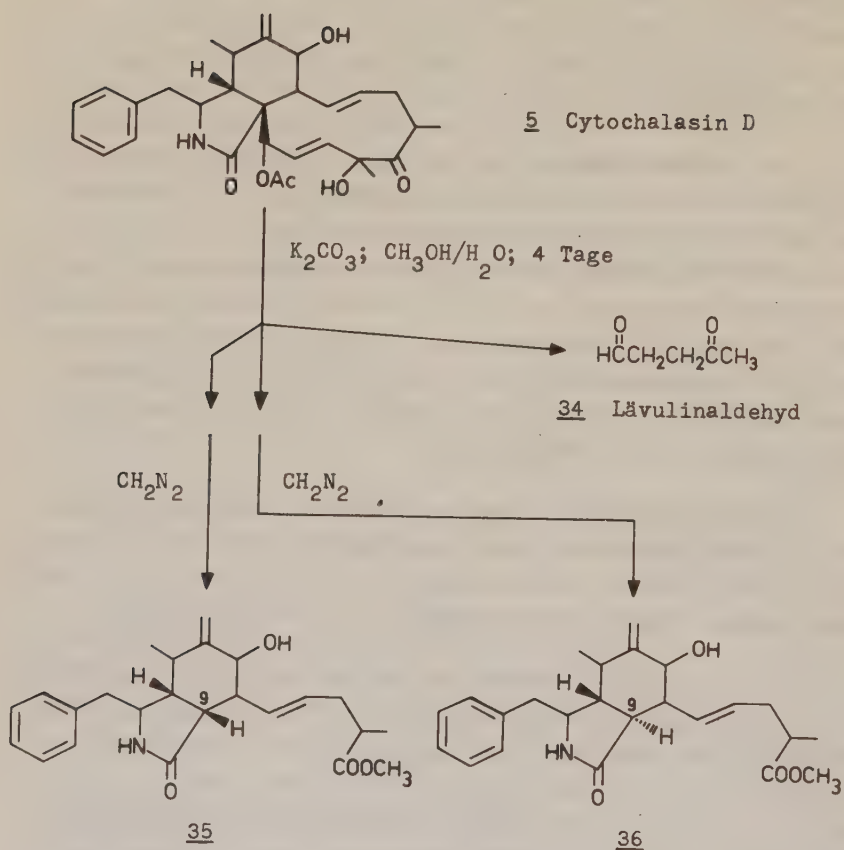
Nach Bhacca und Williams [46] ist die allylische Kopplung zweier Protonen dann maximal, wenn diese rechtwinklig zueinander stehen. Winkelbetrachtungen am Dreiding-Modell von 5, 35 und 36 zeigen, dass die gemessenen Allylkopplungen mit den theoretischen Werten übereinstimmen.

Das normale Vorgehen zur Bestimmung von Ringverknüpfungen mittels NMR.-Spektroskopie ist die Betrachtung der Diederwinkel der Protonen an den Brückenkopfaten und der sich daraus ergebenden Kopplungskonstanten. Dieser Weg war uns hier jedoch versperrt, da die Protonen an C(4) und C(9) von den übrigen Methylen- und Methinprotonen des Moleküls überdeckt sind, also auch ihre Kopplungskonstanten nicht ermittelt werden können. Somit waren wir gezwungen, die vorhin beschriebene umständlichere Betrachtung durchzuführen.

Zusammenfassend kann aus dem Verlauf der Isomerisierung, den IR.- und NMR.-Daten geschlossen werden, dass es sich beim krist. Stoff um das cis-verknüpfte Isomere 35 und bei der amorphen Substanz um das trans-verknüpfte Isomere 36 handelt.

Mit der eingangs erörterten Abbausequenz lassen sich also die 11-Methyl-, die 12-Methylen- und die Methylgruppe an C(16) von der Methylgruppe an C(18) getrennt erfassen. Befindet sich die Radioaktivität ausschliesslich an diesen Gruppen, so erübrigt sich der weitere Abbau. Andernfalls müssen 35 und 36 nach vollständiger Hydrierung einem Kuhn-Roth- und anschliessend einem Schmidt-Abbau unterzogen werden, woraus sich die C-Atome Nr. 5, 6 und 16 als BaCO_3 , die C-Atome Nr. 11 und 12 zusammen mit der Methylgruppe an C(16) als Methylaminpikrat gewinnen lassen.

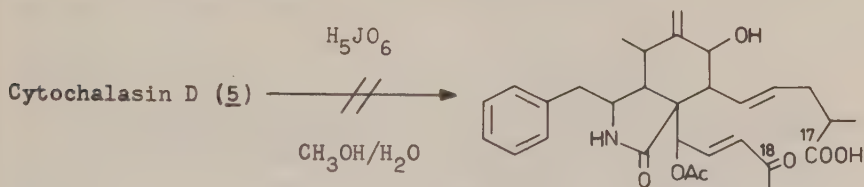
Formelschema 5



6.3.6. Abbausequenz 5 (vgl. Formelschema 6)

Die Methylgruppe an C(18) lässt sich aus der vorigen Abbausequenz nur auf indirektem Weg bestimmen. Um eine präzisere Messung der Radioaktivität zu erreichen, muss diese Methylgruppe als einzelnes Bruchstück direkt erfasst werden.

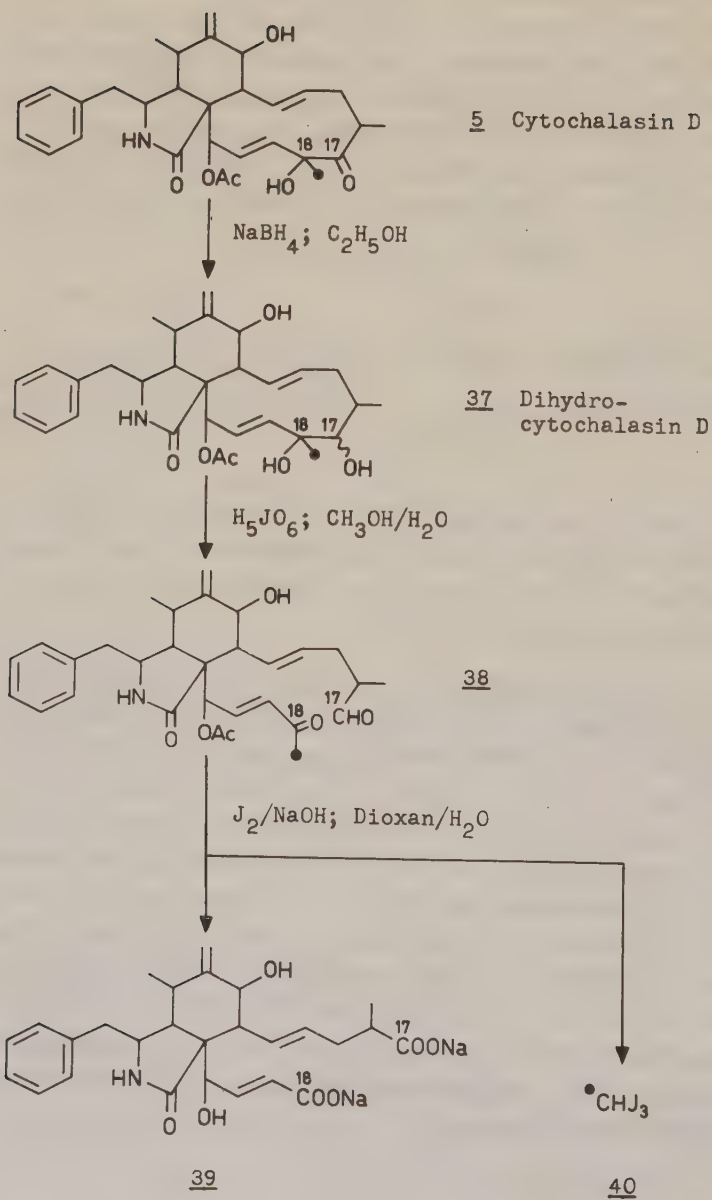
Zuerst versuchten wir, Cytochalasin D (5), das im Makrocyclus eine α -Ketol-Gruppierung trägt, mit Perjodsäure [47] [48] zu spalten. Minato et al. [8] waren bei der Verwendung von Na-perjodat zu keinem Ergebnis gekommen, vermutlich weil die gewählten Reaktionsbedingungen ungünstig waren. Auch uns gelang die Spaltung zur entsprechenden 17,18-seco-Säure mit Perjodsäure in wässrigem Methanol nicht, weder durch viertägiges Stehenlassen bei Raumtemperatur, noch durch 30-stündiges Kochen unter Rückfluss.



Der Angriff der Perjodsäure an der α -Ketol-Gruppierung scheint aus sterischen Gründen sehr erschwert zu sein. Deswegen lässt sich auch aus Cytochalasin D (5) kein 2,4-Dinitrophenylhydrazon bereiten [6].

Da die α -Ketol-Gruppierung an Cytochalasin D (5) von Perjodsäure sich nicht direkt spalten liess, wählten wir den Umweg über das α -Diol. Cytochalasin D (5) wurde mit NaBH_4 in Aethanol behandelt. Es bildeten sich ein unaufgeklärtes Reaktionsprodukt und Dihydrocytochalasin D (37) in Form eines Epimerengemisches bezüglich der an C(17) neu entstandenen Hydroxygruppe. Das Epimerengemisch wurde chromatographisch gereinigt, jedoch nicht getrennt. Im IR.-Spektrum von 37 (in CHCl_3) fällt besonders das Fehlen der Ketonbande bei 1705 cm^{-1} auf. Im UV.-Spektrum von 37 ist die Carbonyl-Absorption, die im UV.-Spektrum von Cytochalasin D (5) bei 281 nm ($\epsilon = 378$) auftritt, verschwunden. Die IR.- und Massenspektren von 37 stimmen mit den Literaturangaben [8] überein.

Formelschema 6



Anschliessend wurde das Dihydrocytochalasin D (37) in wässrigem Methanol während 24 Std. mit Perjodsäure unter Rückfluss erwärmt. Es resultierten in etwa 30 % Ausbeute der 17,18-seco-Aldehyd 38 und 50 % Edukt. Die Ausbeute an 38 ist trotz der energischen Reaktionsbedingungen schlecht, denn vermutlich wird nur das Isomere mit der cis-1,2-Diolgruppierung gespalten.

Der 17,18-seco-Aldehyd 38 zeigt im IR.-Spektrum (in CHCl_3) neben den Carbonylbanden der Acetoxygruppe (1740 cm^{-1}) und des γ -Lactams (1695 cm^{-1}) die Carbonylbanden des Aldehyds (1725 cm^{-1}) und des α,β -ungesättigten Ketons (1685 cm^{-1}) und die Absorption der konjugierten Doppelbindung bei 1640 cm^{-1} . Im UV.-Spektrum von 38 finden wir die Absorption des α,β -ungesättigten Ketons bei 231 nm ($\epsilon = 8800$). Die IR.- und UV.-Spektren von 38 stimmen mit den Literaturangaben [8] überein.

Der 17,18-seco-Aldehyd 38 weist an C(18) eine Methylketon-Gruppe auf, die nach üblicher Methode einer Jodoformreaktion unterzogen wurde. Es entstanden dabei das Na-Salz der 17,18-Dicarbonsäure 39, welches nicht isoliert wurde, und aus der Methylgruppe an C(18) Jodoform (40), das sublimiert und umkristallisiert wurde.

6.3.7. Zusammenfassung der Abbaureaktionen

Die beschriebenen Abbaureaktionen wurden im Hinblick auf die Trennung der mit $[\text{CH}_3\text{-}^{14}\text{C}]$ -L-Methionin markierten Stellen in der Cytochalasin D (5)-Molekel ausgearbeitet. Diese aktiven Stellen sind nach den hypothetischen Biosynthesewegen auf das C-Atom Nr. 12 und den Methylgruppen an C(16) und C(18) beschränkt.

Durch die Abbausequenz 1 werden auf der einen Seite die C-Atome Nr. 5, 6, 16 und 18, auf der anderen Seite die C-Atome Nr. 11, 12 mit den Methylgruppen an C(16) und C(18) jeweils gemeinsam erfasst. Dies erlaubt festzustellen, ob die gesamte Radioaktivität den Annahmen entsprechend tatsächlich nur auf

den Methyl- und Methylengruppen lokalisiert ist.

Die Abbausequenz 2 führt zur Bestimmung der C-Atome Nr. 5, 11, 16, 18 mit den Methylgruppen an C(16) und C(18) zusammen. Durch Differenzbildung mit den Resultaten der Abbausequenz 1 lässt sich die Aktivität der exocyclischen Methylen-
gruppe (C(12)) bestimmen. Für den Abbau des mit $[4'\text{-}^3\text{H}][\text{U-}^{14}\text{C}]$ -L-Phenylalanin markierten Cytochalasin D (5)-Musters ist das nur bei dieser Abbausequenz mögliche Erfassen der Benzoesäure (25) wichtig.

Die Abbausequenz 3 erlaubt die Bestimmung der Methylgruppen an C(16) und C(18) zusammen und der 11-Methylgruppe einzeln. Durch Addition dieser zwei Werte und Differenzbildung mit den Resultaten der Abbausequenz 1 wird wiederum das C-Atom Nr. 12 bestimmt.

Bei der Abbausequenz 4 werden die 11-Methyl-, die 12-Methylen- und die Methylgruppe an C(16) zusammen erfasst. Durch Differenzbildung mit der Abbausequenz 1 lässt sich die Methylgruppe an C(18) bestimmen. Werden die aus den vorherigen Abbausequenzen bekannten Radioaktivitätswerte der C-Atome Nr. 11 und 12 abgezogen, so lässt sich aus dieser Abbausequenz auch die Methylgruppe an C(16) ermitteln.

Die Abbausequenz 5 dient zur präziseren direkten Bestimmung der Methylgruppe an C(18), die als einzige aus diesem Abbau hervorgeht. Durch Differenzbildung mit dem gemeinsamen Messwert der Methylgruppen an C(16) und C(18) in der Abbausequenz 3 wird die Methylgruppe an C(16) erfasst.

Die beschriebenen Abbaureaktionen ermöglichen die direkte Erfassung der Methylgruppe an C(18); die 11-Methyl-, die 12-Methylen- und die Methylgruppe an C(16) werden nur durch Differenzbildung erfasst.

6.4. Resultate der Abbauprobe mit radioaktivem Cytochala- sin D (5)

6.4.1. Allgemeines

Zur Bestimmung der Radioaktivität ¹²⁾ wurden von allen kristallinen Abbauprodukten oder Derivaten drei sukzessive Kristallisate verwendet, bei BaCO₃ zwei Proben. Bei Flüssigkeiten und bei amorphen Verbindungen wurden für die Messungen grössere Mengen eingesetzt, die zweimal vermessen wurden.

Die Substanzproben wurden in Toluol, wenn nötig unter Zusatz von Methanol, gelöst und nach Zugabe eines Scintillators im Flüssigkeits-Scintillationszähler gemessen. BaCO₃ wurde in Komplexon III gelöst und die Aktivität wie oben bestimmt. Durch Beigabe von "Internal Standards" werden die "Quenching"-Effekte berücksichtigt. Treten bei zu stark gefärbten Verbindungen doch zu grosse "Quenching"-Effekte auf, so werden die Substanzproben in reinem Sauerstoff verbrannt, das gebildete CO₂ in einer methanolischen Lösung von Aethanolamin adsorbiert und diese Lösung unter Zusatz des Scintillators gemessen [49]. Alle Werte sind korrigiert; der mittlere quadratische Fehler beträgt bei ¹⁴C-Messungen $\pm 3 \%$ der angegebenen Zählrate, bei ³H und ¹⁴C-Messungen an ein und derselben Probe $\pm 5 \%$ der angegebenen Zählrate. Der grössere Fehler kommt vom ³H-Wert, der durch die Differenz einer ¹⁴C + ³H- und einer ¹⁴C-Messung ermittelt wird.

12) Diese Messungen wurden in den Isotopenlaboratorien der Fa. Sandoz A.G. in Basel unter Herrn Dr. F. Kalberer durchgeführt. An dieser Stelle möchten wir ihm und seinen Mitarbeitern, den Herren H. Galliker und G. Marbach, unseren Dank dafür aussprechen.

Von den Abbauprodukten werden hier nur die Ergebnisse der Aktivitätsbestimmungen wiedergegeben. Eine detaillierte Beschreibung der Versuchsbedingungen für die einzelnen Stufen des Abbaus findet sich im experimentellen Teil.

6.4.2. Darstellung der Ergebnisse

Die Darstellung der Messergebnisse erfolgt in Form einer Tabelle und eines Formeldiagramms. Die Nummern der aktiven Abbauprodukte sind mit den Nummern der inaktiven Produkte gleichgesetzt. Die Messwerte sind in den Tabellen in dpm/mg, dpm/mMol und ferner in Prozent bezogen auf Cytochalasin D (5) ¹³⁾ wiedergegeben. Diese Werte sind die Mittelwerte der Mehrfachbestimmungen.

Verbindungen, die durch Verdünnung der Originalsubstanz resultierten, sind durch einen hochgestellten Strich kenntlich gemacht. Unter den Tabellen sind die Verdünnungsparameter angegeben.

In den Formeldiagrammen sind die Resultate in Prozent der Gesamtaktivität dargestellt und erlauben somit eine bildliche Erfassung der Aktivitätsverteilung im Molekül.

[4'-³H][U-¹⁴C]-L-Phenylalanin

Bei diesen Messungen spielt wegen der kurzen Halbwertszeit von Tritium (12,26 Jahre) das Messdatum eine Rolle. Der Precursor wurde im Frühjahr 1971 eingebaut. Die Messwerte des Precursors und von Cytochalasin D (5) datieren vom 2. 6. 1971. Der Abbau wurde jedoch erst im Januar 1973 durchgeführt. Die Verbindungen 5', 24, 27 und 28 wurden am 7. 3. 1973 vermessen. Die zwischen diesen Messungen liegenden 644 Tage ergeben eine

13) Für die auf Cytochalasin D (5) bezogenen Prozentwerte wird im weiteren die Bezeichnung Prozent der Gesamtaktivität (% d. G. A.) verwendet.

berechnete Erniedrigung der ^3H -Aktivität von 9,5 %. Die gefundenen Werte zeigen eine etwas geringere Erniedrigung; die Abweichung liegt jedoch innerhalb der Messgenauigkeit. Wegen der kleineren ^3H -Aktivität in 5' liegt das $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Verhältnis hier etwas tiefer.

Da nur eine Abbausequenz durchgeführt wurde, war aktives Cytochalasin D (5) in genügender Menge vorhanden und musste nicht verdünnt werden.

Aus Tabelle 4 geht hervor, dass das $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Verhältnis in Cytochalasin D (5) im Vergleich zur Precursorklösung etwas abgenommen hat. Würde Phenylalanin vor dem Einbau in Cytochalasin D (5) decarboxyliert, so müsste dieses Verhältnis ansteigen, da die ^3H -Aktivität gleich bleibt, jedoch die ^{14}C -Aktivität um 1/9 abnimmt. In der Benzoesäure ist das ^3H zu 95 % und das ^{14}C zu 75,4 % vorhanden, was dem erwarteten Verhältnis von 7 : 9 sehr gut entspricht (gefunden 7,14 : 9). Damit ist eindeutig bewiesen, dass Phenylalanin als Ganzes, d.h. ohne Decarboxylierung in das Antibioticum eingebaut wird.

$[\text{CH}_3-^{14}\text{C}]\text{-L-Methionin}$

Für die Vielzahl der durchzuführenden Abbausequenzen konnte die beschränkte Menge an aktivem Cytochalasin D (5) nie ausreichen. Die hohe Zählrate erlaubte hier, mit inaktivem Cytochalasin D (5) zu verdünnen.

Beim letzten Abbauersuch erwies es sich zusätzlich als notwendig, das im Abbau in sehr kleiner Menge anfallende Jodoform (40) für die Messung mit synthetischem Material zu verdünnen. Der Verdünnungsparameter wurde durch die Mikroeinwaage beider Komponenten festgelegt.

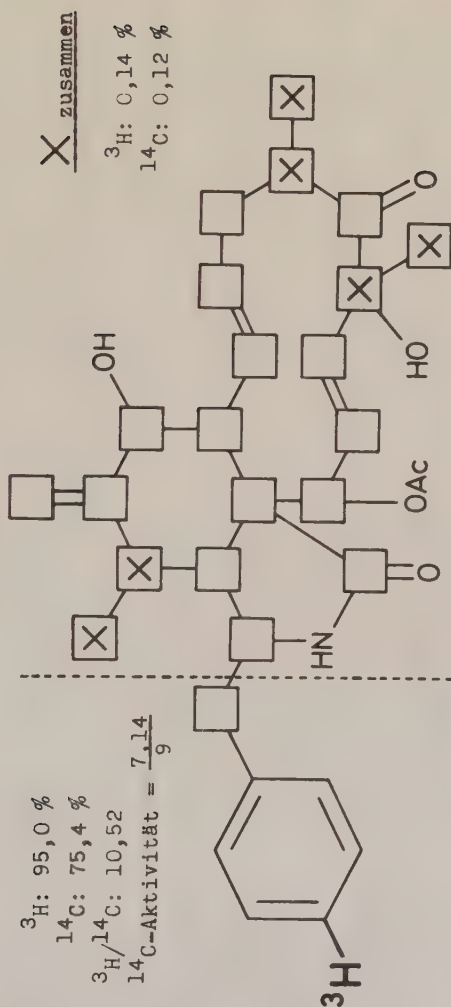
Im ersten Diagramm zur Tabelle 5 sind die Daten der Tabelle graphisch dargestellt. Für das zweite Diagramm wurden die Aktivitäten der einzelnen C-Atome ausgerechnet. Die Prozent-

Tabelle 4: Verteilung der Radioaktivität in Cytochalsin D (5) nach Verabreichung von $[4'-^3\text{H}][\text{U}-^{14}\text{C}]\text{-L-Phenylalanin}$

Nr.	Bezeichnung	Mol Gew	erfasste C-Atome Nr.	Aktivität in dpm/mg	in dpm/mMol	in % d.G.A.	$^3\text{H}/^{14}\text{C}$
--	$[4'-^3\text{H}][\text{U}-^{14}\text{C}]\text{-L-Phenylalanin}$ Precursor	---	---	$^3\text{H}: 22,0 \cdot 10^6$ $^{14}\text{C}: 2,23 \cdot 10^6$	---	---	9,86
<u>5</u>	Cytochalsin D	507	1-21, 10-C-H, 16-CH ₃ , 18-CH ₃	$^3\text{H}: 315'300$ $^{14}\text{C}: 33'390$	$160,0 \cdot 10^6$ $16,95 \cdot 10^6$	---	9,44
<u>5'</u>	Cytochalsin D	507	1-21, 10-C-H, 16-CH ₃ , 18-CH ₃	$^3\text{H}: 294'000$ $^{14}\text{C}: 35'260$	$149,0 \cdot 10^6$ $17,85 \cdot 10^6$	100 100	8,34
<u>24</u>	Desacetyl- cytochalsin D	465	1-21, 10-C-H, 16-CH ₃ , 18-CH ₃	$^3\text{H}: 297'300$ $^{14}\text{C}: 35'860$	$138,5 \cdot 10^6$ $16,65 \cdot 10^6$	93,0 93,2	8,29
<u>27</u>	Benzoessäure-p- -Bromphenacyl- ester	319	C ₆ H ₅ -C(10)	$^3\text{H}: 443'300$ $^{14}\text{C}: 42'130$	$141,5 \cdot 10^6$ $13,45 \cdot 10^6$	95,0 75,4	10,52
<u>28</u>	Essigsäure-p- -Bromphenacyl- ester	257	5,11,16,18, 16-CH ₃ , 18-CH ₃	$^3\text{H}: 800$ $^{14}\text{C}: 80$	205'000 20'500	0,138 0,115	10,0

14) Werte in dpm/ml $\xrightarrow{5 \rightarrow 5'}$ Zeitdifferenz von 644 Tagen

Diagramm zu Tabelle 4



Cytochalasin D (5)

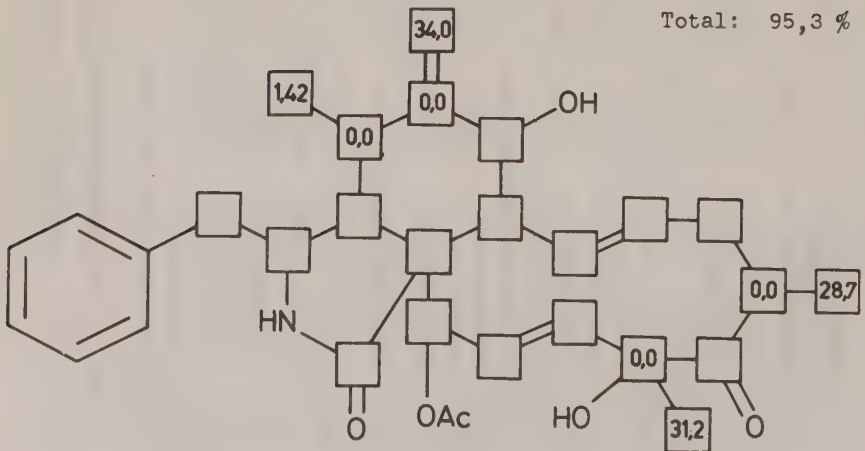
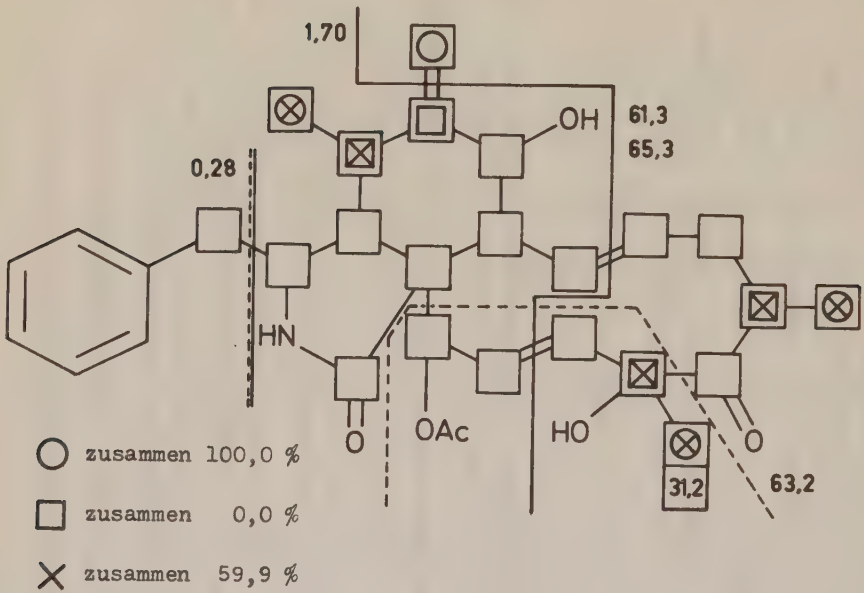
Tabelle 5: Verteilung der Radioaktivität in Cytochalsin D (5) nach Verabreichung von $[\text{CH}_3\text{-}^{14}\text{C}]\text{-L-Methionin}$

Nr.	Bezeichnung	Mol Gew	erfasste C-Atome Nr.	Aktivität		in % d.G.A.
				in dpm/mg	in dpm/mMol	
<u>5</u>	Cytochalsin D	507	1-21, 10-C ₆ H ₅ , 16-CH ₃ , 18-CH ₃	52'200	26,4 · 10 ⁶	--
<u>5'</u>	Cytochalsin D verdünnt	507	1-21, 10-C ₆ H ₅ , 16-CH ₃ , 18-CH ₃	16'270	8,25 · 10 ⁶	100
<u>16</u>	Dodecahydro- cytochalsin D	519	1-21, 10-C ₆ H ₅ , 16-CH ₃ , 18-CH ₃	15'570	8,08 · 10 ⁶	98,0
<u>17</u>	Desacetyldodeca- hydro-cytocha- lasin D	477	1-21, 10-C ₆ H ₅ , 16-CH ₃ , 18-CH ₃	16'530	7,89 · 10 ⁶	95,6
<u>21</u>	BaCO ₃	197	5, 6, 16, 18	0	0	0
<u>23</u>	Methylamin- pikrat	260	11, 12, 16-CH ₃ , 18-CH ₃	7'930	2,06 · 10 ⁶	100,0
<u>24</u>	Desacetylcyto- chalsin D	465	1-21, 10-C ₆ H ₅ , 16-CH ₃ , 18-CH ₃	16'370	7,61 · 10 ⁶	92,3

<u>27</u>	Benzoessäure-p-Bromphenacyl-ester	319	$C_6H_5-C(10)$	73	23'290	0,283
<u>28</u>	Essigsäure-p-Bromphenacyl-ester	257	5, 11, 16, 18, 16-CH ₃ , 18-CH ₃	6'400	$1,645 \cdot 10^6$	59,9
<u>29</u>	Penta-O-acetyl- γ -lactam	575	1-11, 13, 20, 21 10-C ₆ H ₅	244	140'300	1,70
<u>31</u>	Diacetoxymethyl-hexan-diol	262	14-19, 16-CH ₃ , 18-CH ₃	19'300	$5,06 \cdot 10^6$	61,3
<u>32</u>	Triacetoxymethyl-hexanol	304	14-19, 16-CH ₃ , 18-CH ₃	17'750	$5,39 \cdot 10^6$	65,3
<u>35</u> <u>36</u>	isomere Methyl-ester aus Abbausequenz 4	397	1-17, 10-C ₆ H ₅ , 16-CH ₃	13'150	$5,22 \cdot 10^6$	63,2
<u>40'</u>	Iodoform verdünnt	394	18-CH ₃	565	222'500	2,70
<u>40</u>	Iodoform	394	18-CH ₃	--	--	31,2

5 $\longrightarrow$ 5': Verdünnungsparameter 3,21 40 $\longrightarrow$ 40': Verdünnungsparameter 11,57

Diagramme zu Tabelle 5



zahlen ergeben sich durch Differenzrechnungen aus den jeweiligen Tabellenwerten und sind, wo mehrere Bestimmungswege vorlagen, gemittelt worden.

6.5. Diskussion der Resultate

Die aus den Einbauversuchen gewonnenen experimentellen Daten sollen im folgenden mit den Voraussagen verglichen werden, die in Kapitel 6.1. aufgrund der hypothetischen Biosynthesewege gemacht wurden.

[4'-³H][U-¹⁴C]-L-Phenylalanin zeigt eine sehr hohe absolute Einbaurrate (14,15 % bezogen auf ¹⁴C). Aus dem ³H/¹⁴C-Verhältnis des Metaboliten und seiner Abbauprodukte geht hervor, dass L-Phenylalanin ohne vorherige Decarboxylierung eingebaut wird, was unseren Voraussagen und auch der Biosynthese von Phomin (2) entspricht.

[CH₃-¹⁴C]-L-Methionin weist eine noch höhere absolute Einbaurrate (16,2 %) auf. Die 11-Methylgruppe am γ-Lactamteil enthält wie erwartet keine signifikante Aktivität. Sie soll ja nach den Arbeitshypothesen aus Acetat entstehen und die Startereinheit des Oktaketids bilden. Die 12-Methylen- und die Methylgruppen an C(16) und C(18) tragen je ungefähr 1/3 der Gesamtaktivität. Die Abweichungen von diesem theoretischen Wert sind nicht signifikant und werden den experimentellen Ungenauigkeiten zugeschrieben. Bekanntlich lassen sich hochviskose Oele, wie sie zum Teil im Abbau anfielen, selbst durch langes Trocknen im Hochvakuum nicht völlig vom Lösungsmittel befreien; die Messwerte fallen deshalb hier zu tief aus. Wägefehler sind bei den verwendeten kleinen Mengen unumgänglich und können recht gross werden. Wir möchten auch an die Genauigkeit der Radioaktivitätsmessung erinnern, die bei ± 3 % liegt. Aus diesen Gründen scheint es uns nicht vertretbar, aus den unterschiedlichen Aktivitäten der drei Gruppen ihre Einbaureihenfolge abzuleiten.

Die Radioaktivitätsverteilung entspricht der Biosynthesesequenz, bei welcher die Gruppierung C(19)-C(18)-CH₃ aus einer Acetat- und einer C₁-Einheit entsteht. Das Acetat wird während der Synthese des Oktaketids eingegliedert, später tritt die C₁-Einheit hinzu. Die theoretische Variante, diese Gruppierung aus Propionat zu beziehen, und als Ganzes schon bei der Oktaketidsynthese einzubauen, ist somit widerlegt. Dadurch wurde nun auch diese nach Hypothese noch unbestimmte Sequenz aufgeklärt.

[1-¹⁴C]-Na-Malonat. Die absolute Einbaurrate (0,125 %) ist relativ niedrig, was sich auf die geringe Spezifität von Malonat zurückführen lässt. Die Radioaktivitätsverteilung im Molekül wurde wegen der geringen Aktivität der Probe nicht bestimmt.

[2-¹⁴C]-Na-Malonat ⁸⁾ weist eine absolute Einbaurrate (0,244 %) auf, die etwa doppelt so gross ist wie diejenige von [1-¹⁴C]-Na-Malonat. Der höhere Wert wird verständlich, wenn man berücksichtigt, dass bei [1-¹⁴C]-Na-Malonat die Hälfte der eingesetzten Aktivität durch Decarboxylierung verloren geht. Die Aktivitätsverteilung wurde auch hier wegen zu geringer Aktivität nicht ermittelt.

[1-¹⁴C]-Na-Acetat ⁹⁾ wurde mit einer etwa zehnmal höheren absoluten Einbaurrate (2,58 %) als [2-¹⁴C]-Na-Malonat inkorporiert. Dieser gute Einbau ist für einen unspezifischen Precursor wie Acetat erstaunlich, ebenfalls die Steigerung der Einbaurrate in Bezug auf [2-¹⁴C]-Na-Malonat. Bei der Biosynthese von Phomin (2) [31] waren die Verhältnisse umgekehrt und die Einbauraten tiefer: [1-¹⁴C]-Na-Acetat 0,123 % und [2-¹⁴C]-Na-Malonat 1,04 % absolute Einbaurrate. Zur Zeit steht uns keine Erklärung für diese Unterschiede zur Verfügung.

[2-¹⁴C]-Na-Acetat ⁹⁾ zeigt ebenfalls eine höhere absolute Einbaurrate (1,12 %) als die Malonat-Vorläufer. Für einen unspezifischen Precursor ist dieser Einbau recht gut.

[2-¹⁴C]-Na-Propionat ⁹⁾ sollte nach den Ergebnissen der [CH₃-¹⁴C]-L-Methionin-Inkorporation überhaupt nicht eingebaut werden. Die trotzdem signifikante Einbaurate dieses Bausteins (0,319 %) weist darauf hin, dass Propionat wie bei der Biosynthese von Phomin (2) [31] in Form von Acetat eingebaut wird. Die Umwandlung erfolgt nach der Anlagerung von Propionat an Coenzym A via Milchsäure und Brenztraubensäure zu Acetylcoenzym A, wobei die ursprüngliche Carboxylgruppe der Propionsäure verloren geht und die Methylengruppe an ihre Stelle tritt [50]. Aus [2-¹⁴C]-Na-Propionat entsteht auf diesem Weg [1-¹⁴C]-Na-Acetat.

7. Anhang: Struktur des 22-Oxa-[12]-cytochalasans 41

7.1. Isolierung von 41

Die Hydrolyse von Cytochalasin D (5) mit K_2CO_3 in wässrigem Methanol bei Raumtemperatur führt bekanntlich zu Desacetyl - cytochalasin D (24) (vgl. 6.3.3. und [8]). Nach 24 Std. ist der Umsatz vollständig. Die klare, gelbliche Reaktionslösung wird neutralisiert und nach Zugabe von Wasser eingeeengt. Dabei fällt Desacetylcytochalasin D (24) in 84 % Ausbeute in kristalliner Form aus.

Durch Extraktion der Mutterlauge mit Methylenchlorid können weitere 15 % an 24 gewonnen werden. In allen Ansätzen wurde das erhaltene Desacetylcytochalasin D (24) durch Dünnschichtchromatographie in verschiedenen Fließmittelsystemen auf seine Reinheit geprüft. Die Kristalle erwiesen sich immer als einheitlich.

Bei einem Versuch blieben die Kristalle von Desacetylcytochalasin D (24) während fünf Tagen dem Einfluss von Licht und Luft ausgesetzt. Dabei verfärbten sie sich gelblich und zeigten bei der dünnschichtchromatographischen Reinheitskontrolle einen zusätzlichen, weniger polaren Fleck, der beim Besprühen der Dünnschichtplatten mit p-Toluolsulfonsäure in Äthanol und anschliessendem Erwärmen durch seine blau-violette Anfärbung auffiel, die im Gegensatz zur orangebraunen Farbe der Cytochalasin D (5)- und Desacetylcytochalasin D (24)-Flecke steht.

Der entstandene Stoff wurde durch mehrfache präparative Schichtchromatographie abgetrennt und aus Essigester mit Petroläther gefällt. Auf diese Weise konnten aus 388 mg Desacetyl - cytochalasin D (24) 41 mg ($\sim 10\%$) eines reinen, amorphen Präparats erhalten werden, das aus Essigester 10 mg Kristalle vom Smp. $240 - 243^\circ$ lieferte. Mit Ausnahme der NMR.-Spektren wurden alle weiteren Untersuchungen mit diesem krist. Präparat

durchgeführt.

Aus den NMR.-Spektren ging später hervor, dass das amorphe Präparat keine einheitliche Verbindung, sondern ein Isomengemisch darstellt. Durch präparative Dünnschichtchromatographie in einem Aether/Methanol-Fließmittelsystem gelang es, die Isomeren teilweise zu trennen.

Aufgrund der im folgenden beschriebenen spektralen Eigenschaften erteilen wir dem neuen Stoff die Strukturformel 41.

7.2. Ableitung der Struktur von 41 aus den Spektraldaten

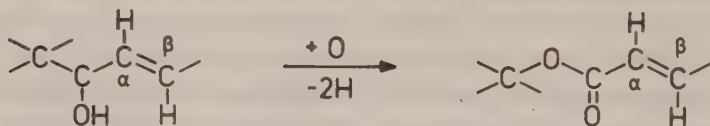
Das IR.-Spektrum zeigt (in KBr) neben den assoziierten OH- und NH-Banden bei $3600 - 3200 \text{ cm}^{-1}$ die für Lactame charakteristische nicht-assoziierte NH-Schwingung bei 3380 cm^{-1} . Die Carbonylabsorption bei 1730 cm^{-1} wird einem α, β -ungesättigten Ester zugeordnet, dessen weitere Schwingungen bei 1640 cm^{-1} ($\text{C}=\text{C}$ konj.) und 1180 cm^{-1} ($\text{C}-\text{O}-\text{C}$) erscheinen. Die Carbonylbande bei 1710 cm^{-1} entspricht einem Keton, die bei 1695 cm^{-1} einem γ -Lactam. Das Vorhandensein eines monosubstituierten Phenylrests folgt aus den Banden bei $3020, 1600, 1490, 755$ und 695 cm^{-1} . Aus dem Vergleich mit dem IR.-Spektrum von Desacetylcytochalasin D (24) gehen als wesentlicher Unterschied nur die Banden der α, β -ungesättigten Estergruppe hervor.

Die im UV.-Spektrum (in Aethanol) gefundene Absorption bei 208 nm ($\epsilon = 7100$) bestätigt die α, β -ungesättigte Estergruppe. Daneben treten die Benzolbanden bei $251, 258, 264$ und 268 nm ($\epsilon = 350 - 210$) und die Ketonbande bei 281 nm ($\epsilon = 135$) auf, die im UV.-Spektrum von Cytochalasin D (5) in gleicher Weise erscheinen.

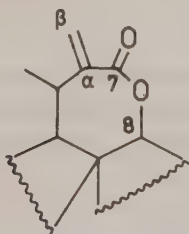
Im Massenspektrum erscheint das Molekel-Ion bei $m/e = 479$. Desacetylcytochalasin D (24) besitzt ein Molekulargewicht von 465 . Die Differenz von 14 Masseneinheiten ist kaum

einem Stickstoffatom zuzuordnen, denn das dabei entstehende Molekül würde zwei Stickstoffatome tragen und müsste deshalb ein geradzahliges Molekulargewicht aufweisen. Plausibler sind das Einführen einer Methylengruppe, z.B. Methoxy- anstelle von Hydroxy-, oder eine doppelte Oxidation, wobei ein Sauerstoffatom hinzukommt und zwei Wasserstoffatome entfernt werden.

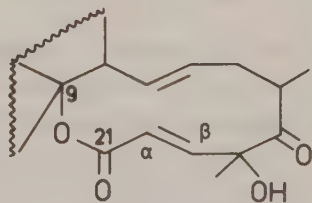
Die im IR.- und UV.-Spektrum neu auftretende α,β -ungesättigte Estergruppe ergibt sich nur aus der doppelten Oxidation. Formal wird eine allylische Hydroxygruppe zu einem α,β -ungesättigten Keton oxidiert und anschliessend ein Sauerstoffatom insertiert.



Da Desacetylcytochalasin D (24) an C(7) und an C(21) eine allylische Hydroxygruppe trägt, sind prinzipiell zwei α,β -ungesättigte Ester den Teilstrukturen I und II entsprechend möglich:



I

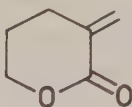


II

Beide Strukturen sind Lactone und können anhand ihrer UV.-Spektren unterschieden werden. Nach Nielsen [51] und Scott [52] liegen die Absorptionsmaxima von offenkettigen, in β -

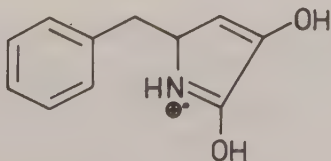
Stellung alkylsubstituierter α, β -ungesättigter Säuren und Estern bei $205 \text{ nm} \pm 5 \text{ nm}$. Dieses System entspricht Struktur II, wo die Lactongruppe im 11-gliedrigen Ring ohne weiteres einem offenkettigen Ester gleichgesetzt werden darf. Nach denselben Autoren befinden sich die Absorptionsmaxima von offenkettigen α, β -ungesättigten Säuren und Estern mit einem Alkylsubstituent in α -Stellung bei $210 \text{ nm} \pm 5 \text{ nm}$. Die Inkremente betragen $+ 6 \text{ nm}$, sofern das System in einem 7-Ring auftritt, und $+ 5 \text{ nm}$, wenn die Doppelbindung exocyclisch angeordnet ist. Damit wird für Struktur I das Absorptionsmaximum rechnerisch auf $221 \text{ nm} \pm 5 \text{ nm}$ festgelegt.

Jones et al. [53] fanden im nachstehenden ähnlichen System das Absorptionsmaximum bei 220 nm ($\epsilon = 5700$).



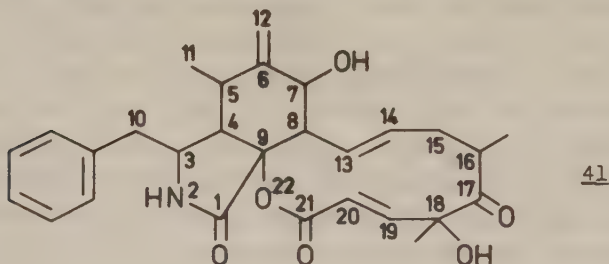
Zählt man für den 7-Ring ein Inkrement von 6 nm hinzu, so ergeben sich 226 nm . Das Absorptionsmaximum von Struktur I wird also kaum unter 220 nm zu liegen kommen, und aufgrund des gemessenen Werts ($\lambda_{\text{max}} = 208 \text{ nm}$, $\epsilon = 7100$) kann die Variante I ausgeschlossen werden. Der berechnete Wert von Variante II ($\lambda_{\text{max}} = 205 \text{ nm} \pm 5 \text{ nm}$) stimmt mit dem experimentellen Wert überein und deutet auf das makrocyclische Lacton hin.

Eine weitere Bestätigung der getroffenen Zuordnung gibt das Fragment-Ion m/e 190 im Massenspektrum. Dieses Fragment entspricht nach Aldridge et al. [3] folgender Struktur, die nur beim makrocyclischen Lacton der Struktur II entstehen kann:



m/e 190

Die bisherigen spektroskopischen Daten sprechen für die Formel 41; sie wird durch NMR.-Spektren, Doppelresonanzversuche und ein hochaufgelöstes Massenspektrum erhärtet.



Das 90-MHz-NMR.-Spektrum ¹⁵⁾ in CDCl_3 (vgl. Fig. 7) zeigt bei $\delta = 7,10$ ppm ein Multipllett, das den 5 aromatischen Protonen entspricht. Dann folgt ein AB-System, dessen linker und rechter Teil bei $\delta = 6,96$ ppm bzw. $\delta = 6,32$ ppm zentriert sind. Es entspricht den Vinylprotonen an C(19) und C(20), die nur untereinander koppeln können ($J_{19,20} = 16$ Hz). Nach Bhacca und Williams [46] erscheint das zur Carbonylgruppe β -stehende Proton bei höherem δ -Wert als das α -stehende. Demnach wurde der linke Teil des AB-Systems dem Proton an C(19) und der rechte Teil dem Proton an C(20) zugeordnet. Die Protonen der 13,14-Doppelbindung bilden ein weiteres AB-System ($J_{13,14} = 16$ Hz), dessen linker Teil (H an C(13)) bei $\delta = 5,79$ ppm durch Aufspaltung mit dem 8-Proton ($J_{8,13} = 10$ Hz) als doppeltes Dublett erscheint. Das Signal des 14-Protons liegt unter den 12-Protonen bei $\delta = 5,0 - 5,3$ ppm verborgen. Das Signal bei $\delta = 5,63$ ppm stammt vom Proton der NH-Gruppierung; es tauscht mit D_2O aus. Die Protonen der exocyclischen Doppelbindung sind zweimal vorhanden, was auf ein Isomerengemisch hin-

15) Dieses Spektrum sowie die Doppelresonanzversuche verdanken wir Herrn H. R. Loosli, Sandoz A.G., Basel. Sie wurden auf einem Bruker HX-90-E-Gerät (mit Fourier Transform) aufgenommen.

weist. Sie absorbieren als breite Singulette bei $\delta = 5,24$ und $5,07$ ppm bzw. $\delta = 5,18$ und $5,01$ ppm. Auch das Proton an C(7) ist doppelt vorhanden. Es erscheint als Dublett ($J_{7,8} = 10$ Hz) bei $\delta = 4,43$ ppm bzw. $\delta = 4,06$ ppm. Aus dem Integral dieser zwei Signale lässt sich ein Isomerenverhältnis von 2 : 1 bestimmen. Bei $\delta = 2,73$ ppm und $\delta = 2,51$ ppm erscheint das AB-System der Benzylprotonen an C(10) ($J_{\text{gem}} = -14$ Hz; $J_{\text{vic}} = 5$ Hz, 7 Hz); bei $\delta = 2,38$ ppm ein Triplett ($J_{7,8} = 10$ Hz; $J_{8,13} = 10$ Hz), das dem Proton an C(8) zuzuordnen ist. Bei $\delta = 4,22$ und $2,01$ ppm treten die Signale der beiden OH-Gruppen auf; beide Protonen tauschen mit D_2O aus. Die Methylgruppe an C(18) ist wiederum zweifach vertreten und erscheint als scharfes Singulett bei $\delta = 1,62$ ppm bzw. $\delta = 1,59$ ppm. Die Methylgruppen an C(5) und C(16) erscheinen, da ein Isomere ngemisch vorliegt, als 7-Linien-Signal zwischen $\delta = 1,26$ und $0,80$ ppm. Der Methylgruppe an C(16) entsprechen die Signale bei $\delta = 1,26$ und $1,16$ ppm bzw. $\delta = 1,19$ und $1,09$ ppm (Dublett; $J = 8$ Hz), der 11-Methylgruppe die Signale bei $\delta = 1,01$ und $0,94$ ppm bzw. $\delta = 0,87$ und $0,80$ ppm (Dublett; $J_{5,11} = 6$ Hz).

Durch Doppelresonanzversuche ¹⁵⁾ (vgl. Fig. 7) konnte die Sequenz der Protonen an C(7), C(8), C(13) und C(14) bewiesen werden. Damit kann Variante I, die kein Proton an C(7) aufweist, definitiv ausgeschlossen werden.

Die Aufnahme des NMR.-Spektrums in $DMSO-d_6$ als Lösungsmittel führt zu einem klareren Bild im linken Teil des Spektrums. Das NH-Signal wird aus dem doppelten Dublett des 13-Protons nach tieferem Feld bis über die aromatischen Protonen hinaus verschoben, welche selber vom AB-System der Vinylprotonen an C(19) und C(20) deutlicher abgesetzt erscheinen. Aus dem Spektrum lassen sich sonst keine weiteren Informationen ablesen.

Alle gemessenen Kopplungskonstanten sind mit den für Cytochalasin D(5) gefundenen Werten in guter Uebereinstimmung. Neben dem Auftreten eines Acetylsignals (Singulett bei $\delta = 2,36$ ppm) zeigt das NMR.-Spektrum von Cytochalasin D (5) in Pyridin- d_5 (vgl. Fig. 8) als wesentlichen Unterschied zum NMR.-

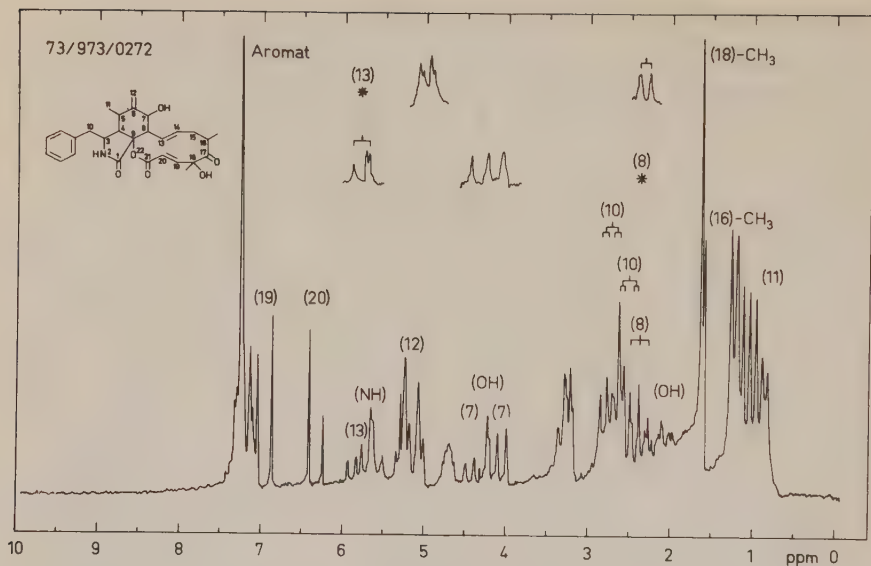


Fig. 7: 90-MHz-NMR.-Spektrum von 41 in CDCl₃

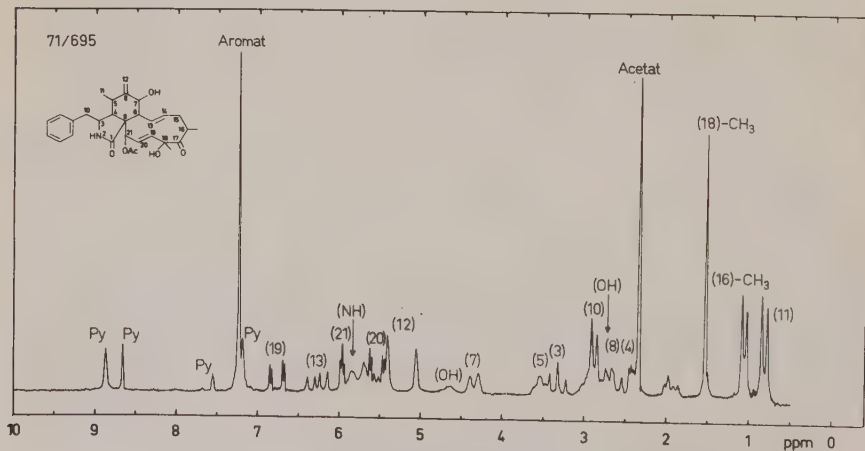


Fig. 8: 100-MHz-NMR.-Spektrum von Cytochalasin D (5) in Pyridin-d₅

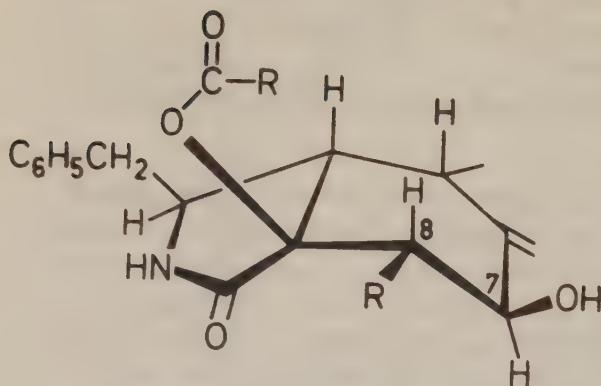
Spektrum von 41 eine weitere Aufspaltung des AB-Systems der Vinylprotonen an C(19) ($\delta = 6,78$ ppm) und C(20) ($\delta = 5,55$ ppm) durch das Proton an C(21), das selber als Triplett bei $\delta = 5,98$ ppm erscheint ($J_{19,21} = 3$ Hz; $J_{20,21} = 3$ Hz). Die vicinale und die allylische Kopplungskonstante weist hier denselben Wert auf.

Die Bildung eines Isomerengemisches lässt sich dadurch erklären, dass für den Eintritt von Sauerstoff in die 22-Stellung die C(9) - C(21)-Bindung geöffnet wird, womit Isomerisierung an C(9) möglich wird. Diese ergibt die trans- oder cis-Verknüpfung der Ringe im Isocyclonanteil der Molekel. Für das cis-verknüpfte Isomere 41a darf die durch die Röntgen-Strukturanalysen von Phosin (2) [8], Cytochalasin D (5) [10] [11] und Cytochalasin E (10) [15] bestimmte Konformation angenommen werden (Raumformel A). Beim trans-verknüpften Isomeren 41b sind prinzipiell zwei Konformationen möglich, die in den Raumformeln B und C wiedergegeben sind.

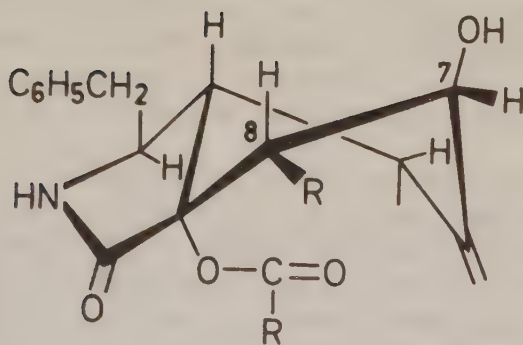
Die im Isomeren 41b verwinkelte Konformation lässt sich mit Hilfe der Kopplungskonstante $J_{7,8}$ bestimmen. Im NMR.-Spektrum von 41 werden die Signale der Protonen an C(7) beider Isomeren ($\delta = 4,43$ und $4,56$ ppm) durch das Proton an C(8) aufgespalten. Die Kopplungskonstante $J_{7,8}$ beträgt in beiden Fällen 10 Hz. Berechnet man aus den Diederwinkeln der Protonen an C(7) und C(8) im Dreiding-Modell die entsprechenden Kopplungskonstanten, so ergeben sich für A $J_{7,8} = 8$ Hz, für B $J_{7,8} = 0$ Hz und für C $J_{7,8} = 9$ Hz. Dadurch wird die Konformation B ausgeschlossen und dem Isomeren 41b die Konformation C zugeordnet.

Aus Raumformel C geht weiter hervor, dass die α -ständige Lactongruppe in 41b sich so stark dem Proton an C(7) nähern kann, dass dieses in den Abschirmungskegel der Carbonylgruppe gerät und im NMR.-Spektrum nach tieferem Feld verschoben wird. Bei der β -ständigen Lactongruppe in 41a (Raumformel A) ist

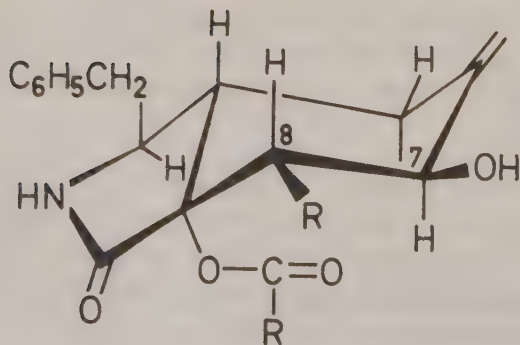
Raumformeln A, B und C



A
41a



B
41b



C
41b

dies jedoch nicht möglich. Infolgedessen kann im NMR.-Spektrum von 4l das Signal bei $\delta = 4,43$ ppm dem trans-verknüpften Isomeren 4lb zugeordnet werden, das Signal bei $\delta = 4,06$ ppm dem cis-verknüpften Isomeren 4la.

Diese Lage der Signale entspricht auch derjenigen in Dehydrophomin (3), einem ähnlichen Makrolidsystem mit cis-verknüpften Ringen. Das Proton an C(7) von 3 erscheint bei $\delta = 3,9$ ppm als Dublett ($J_{7,8} = 11$ Hz) (in CDCl_3) [2].

Ferner lässt sich aus den Raumformeln die Verdoppelung der Signale der Protonen an C(12) im NMR.-Spektrum von 4l erklären. In 4la (Raumformel A) steht die exocyclische Doppelbindung rechtwinklig zur 7-Hydroxygruppe, in 4lb (Raumformel C) liegt sie in der gleichen Ebene wie die 7-Hydroxygruppe. Aus dieser verschiedenen Umgebung der 12-Protonen ergibt sich die verschiedene chemische Verschiebung im NMR.-Spektrum.

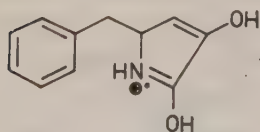
Das aus dem Integral der Signale der Protonen an C(7) abgeleitete Isomerenverhältnis fällt 2 : 1 zugunsten des cis-verknüpften Isomeren 4la aus. Es ist identisch mit dem Verhältnis der cis- und trans-verknüpften Methylester 35 und 36 (vgl. 6.3.5.). Es ist aber nicht ausgeschlossen, dass das Verhältnis durch die Reinigung (Kristallisation, präparative Schichtchromatographie) vor der Messung des NMR.-Spektrums verfälscht worden ist. Ein vor der letzten chromatographischen Reinigung aufgenommenes 90-MHz-NMR.-Spektrum¹⁶⁾ in CDCl_3 zeigte nämlich ein Isomerenverhältnis von 1,33 : 1, was unsere Meinung bekräftigt, dass sich die Isomeren bei der Reaktion in gleicher Menge bilden und erst die spätere Aufarbeitung das Verhältnis verschiebt.

16) Dieses Spektrum verdanken wir Herrn Dr. W. Niederberger, Abteilung Biophysikalische Chemie des Biozentrums, Basel. Es wurde auf einem Bruker HX-90-E-Gerät (mit Fourier - Transform) aufgenommen).

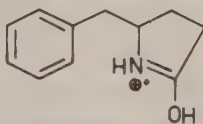
Den definitiven Beweis für die Summenformel von 41 lieferte erst das hochaufgelöste Massenspektrum ¹⁷⁾. Die dabei gefundenen Spitzen und die ihnen entsprechenden Fragment-Summenformeln sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Das Molekel-Ion von 41 kann verschiedene Primärzerfälle eingehen, z.B. Abspaltung von H_2O , CH_3CO und C_7H_7 , was zu den Fragment-Ionen m/e 461, 436 und 388 führt. Das abgespaltene Fragment CH_3CO stammt nicht etwa aus einer Acetatgruppe, sondern aus der Sequenz $CH_3-C(18)-OH$, was aus dem hochaufgelösten Massenspektrum von Cytochalasin D (5) ¹⁷⁾ hervorgeht. Die weiteren Zerfallsreaktionen sind bei der komplexen Struktur von 41 recht unübersichtlich, sodass wir auf die Formulierung einer Zerfallsreihe verzichten.

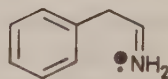
In Analogie zu Aldridge et al. [3] halten wir jedoch für wahrscheinlich, dass den Fragmenten m/e 190, 174 bzw. 120 die folgenden Strukturen zukommen:



m/e 190



m/e 174



m/e 120

Der weitere Zerfall ergibt die Fragmente m/e 105 ($C_6H_5-CH_2-CH_2^+$) und m/e 91 (Tropylium-Ion $C_7H_7^+$).

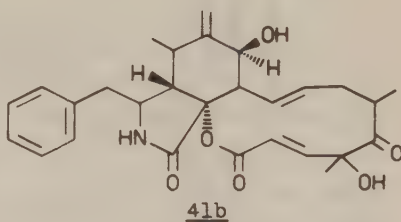
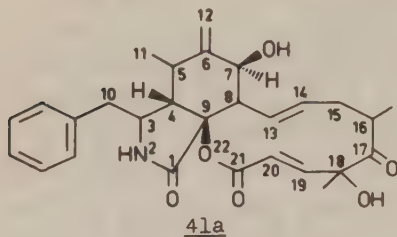
Aufgrund der Spektraldaten halten wir die postulierte Struktur von 41 für gesichert. Die Stereochemie und die absolute Konfiguration der Isomeren 41a und 41b sind durch die Verknüpfung mit Desacetylcytochalasin D (24) festgelegt.

17) Die hochaufgelösten Massenspektren verdanken wir Herrn Dr. H. Lichti, Sandoz A.G., Basel.

Tabelle 6: Fragmente des hochaufgelösten Massenspektrums von 41

Fragmente bei m/e	Intensität in %	Summenformel	Differenz zw. ber. u. gef. Wert	Differenz zu M+	Abgespaltene Bruchstücke
479, 231	39	$C_{28}H_{33}NO_6$	0, 0001		H_2O
461, 224	7	$C_{28}H_{31}NO_5$	0, 0035	18	C_2H_3O
436, 210	8	$C_{26}H_{30}NO_5$	0, 0022	43	C_2H_3O, H_2O
418, 200	29	$C_{26}H_{28}NO_4$	0, 0017	61	C_7H_7
388, 178	54	$C_{21}H_{26}NO_6$	0, 0020	91	C_7H_7, H_2O
370, 163	7	$C_{21}H_{24}NO_5$	0, 0025	109	C_2H_3O, H_2O, C_3H_4O
362, 177	13	$C_{23}H_{24}NO_3$	0, 0017	117	$C_2H_3O, H_2O, C_3H_4O, CO$
334	5			145	
190	4			289	
174, 092	12	$C_{11}H_{12}NO$	0, 0008	305	
120, 081	26	$C_8H_{10}N$	0, 0002	359	
105, 069	26	C_8H_9	0, 0016	374	
91	100	C_7H_7		388	

41a ist demnach (7S,16S,18R)-7,18-Dihydroxy-16,18-dimethyl-10-phenyl-22-oxa-[12]cytochalasa-6(12),13^t,19^t-trien-1,17,21-trion und 41b das an C(9) epimere (7S,16S,18R)-7,18-Dihydroxy-16,18-dimethyl-10-phenyl-22-oxa-9-epi-[12]cytochalasa-6(12),13^t,19^t-trien-1,17,21-trion.



Im NMR.-Spektrum (in CDCl₃):

Proton an C(7) ($J_{7,8} = 10$ Hz) bei

$$\delta = 4,06 \text{ ppm}$$

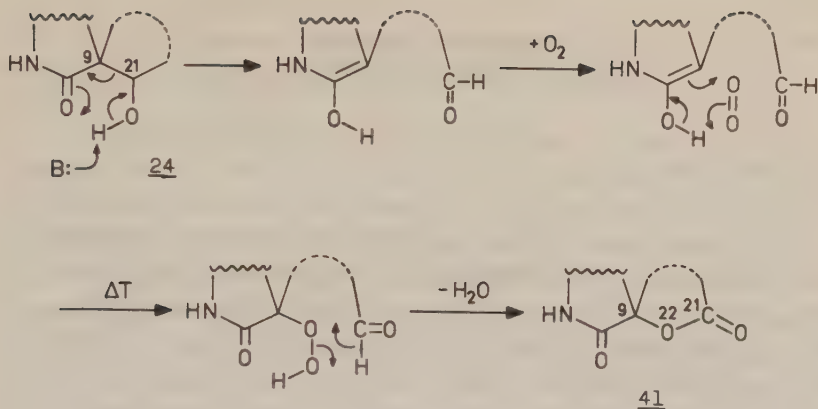
$$\delta = 4,43 \text{ ppm}$$

41 ist der erste Vertreter des sechsten Grundtypus der Cytochalasane, der 22-Oxa-[12]cytochalasane. Es wäre nicht verwunderlich, wenn auch natürliche Vertreter dieser Klasse gefunden würden.

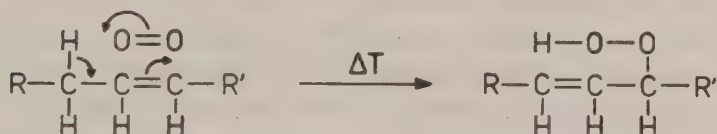
7.3. Hypothetischer Bildungsmechanismus von 41

Für die Bildung von 41 aus Desacetylcytochalasin D (24) durch Autoxidation in fester Phase ist folgender Mechanismus denkbar:

Wie bei der Hydrolyse von Cytochalasin D (5) zu den isomeren Methylestern 35 und 36 (vgl. 6.3.5.) kann hier Desacetylcytochalasin D (24) durch eine Art Retroaldol-Reaktion zwischen C(9) und C(21) gespalten werden. Die katalysierende Base fehlt zwar, doch scheint sie für die Spaltung nicht unerlässlich. Im nächsten Schritt lagert sich molekularer Sauerstoff (O₂) an, wobei die Aldehydgruppe in der Kristallstruktur räumlich fixiert bleibt. Das System lagert beim Erwärmen (z.B. Sonne) um unter Bildung eines 9-Hydroperoxids (α - oder β -ständig angeordnet ,



was die Bildung des Epimerengemisches erklärt). Diese Umlagerung entspricht dem von Ingold [54] postulierten allgemeinen Mechanismus für die Bildung von Hydroperoxiden durch Autoxidation mit Luftsauerstoff.



Der Zerfall von Hydroperoxiden zu Aldehyd und Wasser und die Folgereaktion des entstandenen Aldehyds mit einem zweiten Äquivalent Hydroperoxid führen bekanntlich zur Bildung eines Esters [54]. Durham et al. haben Mechanismus [55] und Kinetik [56] einer solchen Reaktionssequenz bestimmt. In ähnlicher Weise kondensieren im letzten Schritt unseres Reaktionsmechanismus das Hydroperoxid und der Aldehyd unter Wasserabspaltung zum Lacton 41.

Der postulierte Mechanismus ist rein hypothetisch. Versuche unter Ausschluss von O_2 oder mit $^{18}\text{O}_2$ könnten über die Herkunft des Lactonsauerstoffs Klarheit verschaffen.

B. EXPERIMENTELLER TEIL

1. Allgemeines

Die Schmelzpunkte wurden auf dem Kofler-Block im Dunkelfeld bestimmt und sind korrigiert. Substanzproben für Spektren, Drehungen, Mikroanalysen und Radioaktivitätsmessungen wurden in der Regel 16 Std. bei Raumtemperatur und 0,01 Torr getrocknet. BaCO_3 -Proben wurden 3 Std. unter einer IR.-Lampe getrocknet. Die Mikroanalysen wurden im mikroanalytischen Labor des Instituts für organische Chemie (E. Thommen) ausgeführt. Die IR.-Spektren in KBr, die UV.- und 60-MHz-NMR.-Spektren wurden im Spektrallabor desselben Instituts (K. Aegerter) aufgenommen, die IR.-Spektren mit einem Perkin-Elmer-IR.-Gitterspektrometer, Modell 125, die UV.-Spektren mit einem Beckmann-D.K.2-Spektrophotometer und die 60-MHz-NMR.-Spektren mit einem Varian-A60-Spektrometer. Im Spektrallabor des physikalisch-chemischen Instituts wurden die 100 MHz-NMR.-Spektren mit einem Varian-HA-100D-Spektrometer (E. Wullschleger, E. Jutzi, R. Wiessler) und die niederaufgelösten Massenspektren mit Geräten vom Typ AEI-MS-30 und Hitachi-Perkin-Elmer-RMU-7 (Dr. J. Vogt, A. Raas) vermessen. In den Spektrallaboratorien der Fa. Sandoz A.G., Basel, wurden die 90-MHz-NMR.-Spektren mit einem Bruker HX-90-E-Gerät mit Fourier-Transform (H. R. Loosli) und die hochaufgelösten Massenspektren mit einem CEC-Massenspektrometer 21-110B (Dr. H. Lichti) aufgenommen. Einige 90-MHz-NMR.-Spektren verdanken wir auch Herrn Dr. W. Niederberger, Abteilung Biophysikalische Chemie des Biozentrums.

Allen erwähnten Herren sei an dieser Stelle für ihre Hilfsbereitschaft und ihre Bemühungen herzlich gedankt.

Zur Aufnahme der IR.-Spektren in Lösung wurde ein Beckman-IR-8-Spektrometer benutzt, zur Bestimmung der optischen Drehung ein Perkin-Elmer-Polarimeter, Modell 141.

Zur Säulenchromatographie (SC) diente "Kieselgel 0,05 - 0,20 mm" (70 - 350 mesh) der Firma E. Merck, Darmstadt. Für die präparative Schichtchromatographie (PDC) benutzten wir "Kieselgel PF₂₅₄" (E. Merck) sowie Fertigplatten der Fa. E. Merck (Schichtdicke 2 mm und 0,25 mm). Für die Dünnschichtchromatographie (DC) wurde "Kieselgel G nach Stahl" (E. Merck) unter Zusatz von Zinksilikat verwendet sowie Fertigplatten der Fa. E. Merck (Schichtdicke 0,25 mm). Zur Sichtbarmachung von Substanzen auf PDC wurden UV-Licht, auf DC UV-Licht, Jod-Dämpfe oder spezifische Sprühreagenzien verwendet.

Wir möchten an dieser Stelle nicht unterlassen, Frau N. Lebet für die Durchführung einzelner chromatographischer Arbeiten zu danken.

In den NMR.-Spektren bedeuten: s = Singulett, d = Dublett, dd = Doppeldublett, t = Triplett, dt = Doppeltriplett, m = Multiplett, J = Spin-Spin-Kopplungskonstante, gem = geminal und all = allylisch.

2. Züchtung der Mikroorganismen und Isolierung der Metaboliten

2.1. Züchtung von *Metarrhizium anisopliae*

Die Züchtung erfolgte in Stand-, Schüttel- und Rotationskulturen zu je 250 ml Nährlösung. 5 Liter Nährlösung, die pro Liter 25 g Zucker, 0,4 g Weinsäure, 0,25 g MgCO₃, 0,25 g NH₄NO₃, 0,4 g K₂CO₃, 0,4 g (NH₄)₂HPO₄, 0,2 g (NH₄)₂SO₄, 0,05 g FeSO₄, 0,05 g ZnSO₄ und entionisiertes Wasser enthielten (Raulin-Thom-Medium, vereinfacht nach Mosseray [38], wurden auf 20 l Liter-Erlenmeyer verteilt. Das Nährmedium wurde im Druckautoklaven sterilisiert und nach Abkühlen mit einer Suspension von *Metarrhi-*

zium anisopliae-Sporen angeimpft. Die Inkubationszeit betrug 14 bis 19 Tage bei 27°.

Beim Fermenteransatz wurden 30 Liter derselben Nährlösung im Fermenterkessel mit Dampf sterilisiert und nach dem Abkühlen mit 100 ml ausgewachsener Rotationskultur von Metarrhizium anisopliae angeimpft. Die Inkubationszeit betrug hier nur 12 Tage bei 27°.

2.2. Extraktion der Antibiotica aus Kulturen von Metarrhizium anisopliae

Die Kulturbrühe wurde abfiltriert und das saure Kulturfiltrat mit 2N Na_2CO_3 neutral gestellt. 5 Liter Kulturfiltrat wurden mit je 5 Liter Chloroform oder Essigester fünfmal ausgerührt, und der Extrakt wurde dreimal mit je 1 Liter Wasser gewaschen. Das Mycel wurde in einem Mixer zweimal mit je 2 Liter Aceton zermahlen. Die so gewonnenen Mycel- und Kulturfiltratextrakte wurden einzeln filtriert und im Vakuum auf ein Volumen von 500 ml eingeengt. Trocknen über Na_2SO_4 und völliges Einengen im Vakuum bei 60° lieferte etwa 1,5 g Rohextrakt aus dem Kulturfiltrat und 1g Rohextrakt aus dem Mycel.

Die dunkelbraunen harzigen Rohextrakte wurden je an der 50 - 100-fachen Menge Kieselgel chromatographiert. Wegen der geringen Löslichkeit der Rohextrakte im Elutionsmittel wurden diese an 10 % der Kieselgelmenge adsorbiert und so auf die Säule gebracht. Elution mit Benzol/Chloroform (Gradient von 0 - 100 %) und anschliessend mit Chloroform/Methanol (Gradient von 0 - 100 %) ergaben weder Cytochalasin C (4) noch Cytochalasin D (5).

2.3. Züchtung von Zygosporium masonii

Die Züchtung erfolgte in Fermenterkulturen von 6 - 100 Liter Grösse. 10 Liter Nährlösung, die pro Liter 30 g D-Glucose, 20 g Pepton, 5 g NaCl und entionisiertes Wasser ent-

hielten, wurden im Fermenterkessel angesetzt und anschliessend im Druckautoklaven sterilisiert. Nach Abkühlen wurde das Nährmedium mit 250 ml ausgewachsener Rotationskultur von Zygosporium masonii angeimpft.

Zum Animpfen wurde eine Apparatur entwickelt, die aus einem von zwei Glasrohren durchsetzten Stopfen bestand. Das dünnere Rohr wurde über einen Schlauch mit einem Calciumchlorid-Rohr verbunden, das mit Watte gestopft war. Auf das dickere Rohr wurde ein mit einem Wattebausch verschlossener Schlauch aufgesetzt (vgl. Fig. 9). Die Schläuche und der Stopfen waren aus Silicongummi, da PVC und normaler Gummi mehrmaliges Sterilisieren nicht aushalten.

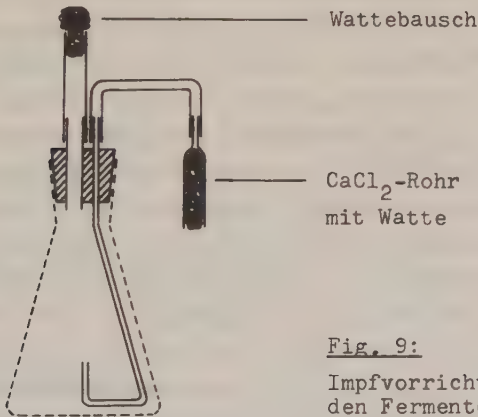


Fig. 9:

Impfvorrichtung für
den Fermenter

Die sterile Apparatur wurde im Impfkasten auf den Erlenmeyer aufgesetzt, der die Impfkultur enthielt. Dann wurde der dickere Schlauch mit dem Einfüllstutzen des Fermenters verbunden und durch Kippen der Apparatur der Fermenter angeimpft. Die nachströmende Luft wurde dabei durch die Watte im Calcium-

chlorid-Rohr sterilfiltriert.

Die Fermenterbedingungen waren: Rührer 300 Umdrehungen pro Min., Luftzufuhr 7 Liter pro Min. bei 0,5 Atm. und 28°. Als Antischaummittel wurde eine Lösung von 10 % Polypropylen-glycol 2020 in "Antimousse B", Sandoz, verwendet, die bei Bedarf automatisch in den Fermenterkessel gepumpt wurde. Bei Inkorporationsversuchen erfolgte die Zugabe der wässerigen Lösung des radioaktiven Vorläufers zwischen 0 und 45 Std. nach dem Animpfen. Die Inkubationszeit betrug 4 - 5 Tage.

2.4. Isolierung von Cytochalasin D (5) aus Kulturen von *Zygosporium masonii*

Die 10 Liter Kulturbrühe wurden mit 10 Liter Aethanol versetzt und über Nacht im Kühlraum (+ 2°) stehengelassen. Anschliessend wurde das Mycel abfiltriert und mit fünfmal 1 Liter Aethanol gewaschen. Die 25 Liter Kulturfiltrat wurden im Vakuum auf etwa 1 Liter eingengt, neutralisiert und mit je 1 Liter Methylenchlorid fünfmal ausgezogen. Der erhaltene Extrakt wurde dann im Vakuum auf 500 ml eingengt und mit jeweils 100 ml 2N Na_2CO_3 und Wasser dreimal gewaschen. Trocknen über Na_2SO_4 und völliges Einengen im Vakuum bei 60° lieferte etwa 6 g öligen gelben Rohextrakt, der Festkörperpartikel einschloss. Der Rohextrakt wurde mit Petroläther ausgezogen, um das Antischaummittel zu entfernen. Zurück blieben etwa 2 - 3 g gelblicher Festkörper, der an der 50 - 100-fachen Menge Kieselgel chromatographiert wurde (Elution mit Methylenchlorid/Methanol 98 : 2). Eine zweite Trennung an Kieselgel (Elution mit Methylenchlorid/Methanol 99:1) führte schliesslich zu reinem Cytochalasin D (5), welches aus Aceton/n-Hexan umkristallisiert wurde. Die Ausbeute an Cytochalasin D (5) betrug je nach Ansatz 80 - 260 mg/Liter Kulturbrühe.

Das isolierte Cytochalasin D (5) war DC-einheitlich (Eluens Methylenchlorid/Methanol/Ameisensäure 90 : 5 : 5) und

bildete kleine, farblose Nadeln vom Smp. 259 - 260°, die nach Smp., Mischsmp., $[\alpha]_D$ und DC mit authentischem Material identisch waren.

$$[\alpha]_D^{24} = + 26^\circ \pm 2^\circ \quad (c = 0,86 \text{ in Methanol})$$

$$[\alpha]_D^{24} = - 8^\circ \pm 1^\circ \quad (c = 0,86 \text{ in Dioxan})$$

$$[\alpha]_D^{24} = - 42^\circ \pm 2^\circ \quad (c = 0,74 \text{ in Chloroform})$$

UV.-Spektrum (Aethanol): Maxima bei 226 (3,54); 258 (2,74); 261 (2,66); 264 (2,64); 268 (2,60) und 283 (2,57) nm ($\log \epsilon$).

IR.-Spektrum (KBr): u.a. Banden bei 3420 (NH); 3240; 3600 - 3200 (OH, NH assoz.); 3080 ($C=CH_2$); 3020 (Arom.); 2960, 2930, 2910, 2870, 2850 (CH); 1740, 1705, 1695 ($C=O$; Ester, Keton, Lactam); 1605, 1495 (Arom.); 1445, 1365; 1230 ($C-O-C$); 1050, 1010 ($C-O-H$); 960, 910; 750, 690 (monosubst. Arom.) cm^{-1} .

NMR.-Spektrum (100 MHz, Pyridin- d_5): vgl. Fig. 8.

Massenspektrum (hochaufgelöst): u.a. Spitzen bei m/e 507, 2616 (M^+ $C_{30}H_{37}NO_6$ (ber. 507,2621); 489 (M^+-18 , H_2O); 479, 268 (M^+-28 , CO); 464, 244 (M^+-43 , Acetyl); 447, 240 (M^+-60 , Essigsäure); 416, 208 (M^+-91 , Benzyl); 338, 213 ($C_{22}H_{28}NO_2$); 320, 203 ($C_{22}H_{26}NO$); 254, 154 ($C_{17}H_{20}NO$); 174, 094 ($C_{11}H_{12}NO$); 120, 085 ($C_8H_{10}N$); 105, 073 (C_8H_9) und 91 (C_7H_7 , Tropyliumion, Basisspitze).

$C_{30}H_{37}NO_6$ (507) Ber. C 70,98 H 7,35 %

Gef. " 71,07 " 7,39 %

3. Abbausequenz 1

3.1. Dodecahydrocytochalasin D (16)

Eine Lösung von 401 mg Cytochalasin D (5) (0,790 mmol) in 25 ml Eisessig wurde mit 200 mg PtO_2 während 5 Std. hydriert. Nach Abfiltrieren des Katalysators wurde eingedampft und in Benzol/Aethanol sooft aufgenommen und wieder eingedampft, bis kein Essigsäuregeruch mehr wahrnehmbar war. Nach Trocknen im Vakuum resultierten 411 mg Dodecahydrocytochalasin D (16)

(0,790 mMol, 100 % d. Th.) als Isomerengemisch in Form eines farblosen Schaums.

Die Isomeren wurden durch PDC in Aether/Methanol 96 : 4 getrennt, und anschliessend wurden das unpolarere Isomere 16a durch PDC in Aether (2-mal) und das polarere Isomere 16b durch PDC in Aether/Methanol 95:5 gereinigt. Aus 44 mg Isomerengemisch 16 resultierten 10 mg 16a und 18 mg 16b.

Dodecahydrocytochalasin D 16a:

R_f = 0,65 (Aether/Methanol 96:4), amorph,

$[\alpha]_D^{24} = -24^\circ \pm 2^\circ$ (c = 0,56 in Methanol)

$[\alpha]_D^{24} = -37^\circ \pm 2^\circ$ (c = 0,52 in Chloroform).

UV.-Spektrum (Aethanol): Maximum bei 274 nm (log ε = 1,88).

IR.-Spektrum (CHCl₃): u.a. Banden bei 3630 (OH); 3430 (NH); 3600 - 3200 (OH, NH assoz.); 2980, 2930, 2860 (CH); 1730, 1705, 1690 (C=O; Ester, Keton, Lactam); 1445, 1380; 1240 (C-O-C); 1070, 1015 (C-O-H); 950 cm⁻¹.

NMR.-Spektrum (90-MHz mit Fourier-Transform, CDCl₃): u.a. Signale bei 6,10 (s, 1H); 5,20 (m, 1H); 4,55 (s, 1H); 3,63 (m, 1H); 3,33 (m, 1H); 2,83 (m, 1H); 2,04 (s, 3H, Acetoxy an C(21)); 1,45 (s, 3H, Methyl an C(18)); 1,24 - 0,95 (m, 9H, Methyl an C(5), C(6) und C(16)) ppm.

Massenspektrum: u.a. Spitzen bei m/e 519 (M⁺); 501 (M⁺-18, H₂O); 491 (M⁺-28, CO); 476 (M⁺-43, Acetyl); 459 (M⁺-60, Essigsäure); 262 (Basisspitze); 180; 126.

Dodecahydrocytochalasin D 16b:

R_f = 0,50 (Aether/Methanol 96:4), Smp. 214 - 216°,

$[\alpha]_D^{24} = -25^\circ \pm 2^\circ$ (c = 0,63 in Methanol);

$[\alpha]_D^{24} = -37^\circ \pm 2^\circ$ (c = 0,64 in Chloroform).

UV.-Spektrum (Aethanol): Maximum bei 274 nm (log ε = 1,70).

IR.-Spektrum (CHCl₃): identisch mit IR.-Spektrum von 16a.

NMR.-Spektrum (90-MHz mit Fourier-Transform, CDCl₃): u.a. Signale bei 5,96 (s, 1H); 5,22 (m, 1H); 4,75 (s, 1H); 3,45

(m, 1H); 3,08 (m, 1H); 2,80 (m, 1H); 1,99 (s, 3H, Acetoxy an C(21)); 1,46 (s, 3H, Methyl an C(18)); 1,26 - 0,97 (m, 9H, Methyl an C(5), C(6) und C(16)) ppm.

Massenspektrum: identisch mit Massenspektrum von 16a.

3.2. Desacetyldodecahydrocytochalsin D (17)

Zu einer Lösung von 357 mg Dodecahydrocytochalsin D (16) (0,687 mMol) in 20 ml Methanol und 5 ml Wasser wurden 958 mg K_2CO_3 (6,95 mMol) gegeben. Nach 24 Std. Rühren bei Raumtemperatur wurde die klare, farblose Lösung mit 2N HCl sauer gestellt und im Vakuum eingeeengt. Desacetyldodecahydrocytochalsin D (17) kristallisierte in farblosen Nadeln (274 mg, 83 % d. Th.) aus. Die Mutterlaugen wurden mit Methylenchlorid fünfmal extrahiert, und der Extrakt zweimal mit Wasser gewaschen. Nach Trocknen mit Na_2SO_4 und Eindampfen resultierten daraus weitere 37 mg 17 (12 % d. Th.). Die Gesamtausbeute betrug 311 mg 17 (0,653 mMol, 95 % d. Th.), das entsprechend dem Edukt 16 aus einem Isomerengemisch bestand.

Die Isomeren 17a und 17b wurden nicht getrennt, sondern gemeinsam durch Chromatographie an Kieselgel mit Methylenchlorid/Methanol 99:1 gereinigt und anschliessend aus Aceton/Petroläther gefällt.

IR,-Spektrum ($CHCl_3$): u.a. Banden bei 3600 (OH); 3430 (NH); 3600 - 3200 (OH, NH assoz.); 2930, 2860 (CH); 1705, 1670 (C=O; Keton, Lactam); 1450, 1375; 1080, 1015 (C-O-H); 940 cm^{-1} .

Massenspektrum: u.a. Spitzen bei m/e 477 (M^+); 459 (M^+-18 , H_2O); 449 (M^+-28 , CO); 441 (M^+-36 , $2H_2O$); 431 (M^+-46 , $H_2O + CO$); 413 (M^+-64 , $2H_2O + CO$); 262 (Basisspitze); 180; 126.

3.3. Kuhn-Roth-Oxidation von Desacetyldodecahydrocytochalsin D (17)

58,6 mg 17 (0,123 mMol) wurden mit 10 ml Oxidationslösung nach Kuhn-Roth (100 g CrO_3 in 600 ml Wasser und 150 ml konz.

H₂SO₄) in zwei Bombenrohren im Schüttelautoklaven 2 Std. auf 135° erhitzt. Die nach dem Abkühlen vereinigten Oxidationsgemische wurden während 30 Min. mit Wasserdampf destilliert und das Destillat (400 ml) mit 0,01N NaOH gegen Phenolphthalein titriert. Nach Abzug des Blindwerts ergab die Titration einen Verbrauch von 42,38 ml NaOH (0,413 mMol Essigsäure (18), 84 % d. Th.).

Die wässrige Phase wurde im Vakuum eingedampft und das Na-Acetat (19) zur Durchführung des Schmidt-Abbaus in einen Y-Kolben überführt.

3.4. Schmidt-Abbau von Natriumacetat (19)

41,3 mg Na-Acetat (19) (0,413 mMol) wurden in einer verschlossenen Spezialapparatur bei 14 Torr mit 123 mg NaN₃ (1,9 mMol) und 3 g Polyphosphorsäure/Wasser 95:5 während 1,5 Std. auf 90° erwärmt. Das entstandene CO₂ (20) wurde in 30 ml einer wässrigen Ba(OH)₂-Lösung, die 48 g Ba(OH)₂ und 18 g BaCl₂ pro Liter enthielt, aufgefangen. Das BaCO₃ (21) wurde unter N₂ abzentrifugiert, dreimal mit Wasser und zweimal mit Methanol gewaschen und 3 Std. unter einer IR.-Lampe getrocknet. Es resultierten 71 mg BaCO₃ (21) (0,361 mMol, 87 % d. Th.).

Die phosphorsaure Lösung von Methylamin (22) wurde mit 15 ml Wasser verdünnt und in einer geschlossenen Wasserdampfdestillations-Apparatur mit 10 ml 30-proz. NaOH-Lösung basisch gestellt. Dann wurde mit Wasserdampf destilliert, und das Destillat (300 ml) in einer Vorlage von 257 mg Pikrinsäure in 5 ml Aethanol und 25 ml Wasser aufgefangen. Das Wasser wurde im Vakuum abdestilliert und der trockene Rückstand von Methylaminpikrat (23) und Pikrinsäure dreimal mit je 3 ml Benzol aufgeköcht, wobei nur die Pikrinsäure in Lösung ging. Das Benzol wurde abpipettiert und der Rückstand aus Aethanol umkristallisiert. Es resultierten 73,5 mg reines Methylaminpikrat (23) (0,283 mMol, 69 % d. Th.) vom Smp. 207 - 209° (Zers.), welches nach Smp. und Mischsmp. mit einem authentischen Präparat identisch war.

4. Abbausequenz 2

4.1. Desacetylcytochalasin D (24)

Eine Lösung von 503 mg Cytochalasin D (5) (0,991 mMol) in 30 ml Methanol und 6 ml Wasser wurde mit 1,363 g K_2CO_3 (9,90 mMol) versetzt. Nach 24 Std. Rühren bei Raumtemperatur wurde die klare, gelbliche Lösung mit 2N HCl neutral gestellt und im Vakuum eingengt. Desacetylcytochalasin D (24) kristallisierte in farblosen Prismen (388 mg, 84 % d. Th.) aus. Die Mutterlaugen wurden mit Methylenchlorid fünfmal ausgeschüttelt und der Extrakt zweimal mit Wasser gewaschen. Nach Trocknen mit Na_2SO_4 und Eindampfen resultierten daraus weitere 71 mg 24 (15 % d. Th.). Die Gesamtausbeute betrug 459 mg 24 (0,987 mMol, 99 % d. Th.), das vorerst noch DC-einheitlich war, sich jedoch im Verlaufe einiger Tage teilweise zu 41 zersetzte.

24 und 41 wurden durch PDC mit Methylenchlorid/Methanol 90:10 getrennt. Anschliessendes Umkristallisieren aus Essigester lieferte 24 in kleinen, farblosen Prismen vom Smp. 185 - 187°. $[\alpha]_D^{24} = -15^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,58$ in Dioxan).

IR.-Spektrum ($CHCl_3$): u.a. Banden bei 3610, 3550 (OH); 3420 (NH); 3600 - 3200 (OH, NH assoz.); 3080 ($C=CH_2$); 3030 (Arom.); 2980, 2930 (CH); 1690 ($C=O$; Keton, Lactam); 1600, 1495 (Arom.); 1080, 1010 (C-O-H); 970, 910 cm^{-1} .

NMR.-Spektrum (60 MHz, $CDCl_3$): u.a. Signale bei 7,25 (m, 5H, Phenylrest); 5,95 (s, 1H, N(2), tauscht mit D_2O aus); 5,30 (s, 2H, C(12) + ?); 5,07 (s, 1H, C(12)); 4,00 (m, 1H, C(21)); 3,77 (d, 1H, C(7), $J_{7,8} = 11$ Hz); $\sim 3,2$ und $\sim 2,6$ (je 1H, OH, tauscht mit D_2O aus); 1,52 (s, 3H, Methyl an C(18)); 1,15 (d, 3H, Methyl an C(16), $J = 7$ Hz); 1,02 (d, 3H, C(11), $J_{5,11} = 7$ Hz) ppm.

Massenspektrum: u.a. Spitzen bei m/e 465 (M^+); 447 ($M^+ - 18, H_2O$); 437 ($M^+ - 28, CO$); 429 ($M^+ - 36, 2H_2O$); 419 ($M^+ - 46, H_2O + CO$); 401 ($M^+ - 64, 2H_2O + CO$); 374 ($M^+ - 91, Benzyl$); 338; 320; 254; 174;

120; 105; 91 (Basisspitze).

4.2. Kuhn-Roth-Oxidation von Desacetylcytochalasin D (24)

64,1 mg 24 (0,138 mMol) wurden mit 10 ml verdünnter Oxidationslösung nach Kuhn-Roth (100 gr CrO_3 in 900 ml Wasser und 150 ml konz. H_2SO_4) in zwei Bombenrohren im Schüttelautoklaven 1 Std. auf 130° erhitzt. Die nach dem Abkühlen vereinigten Oxidationsgemische wurden während 30 Min. mit Wasserdampf destilliert und das Destillat (400 ml) mit 0,01N NaOH gegen Phenolphthalein titriert. Nach Abzug des Blindwerts ergab die Titration einen Verbrauch von 41,01 ml NaOH (0,400 mMol Benzoesäure (25) und Essigsäure (26) zusammen, 73 % d. Th.).

Die Lösung des Na-Benzoats (25a) und Na-Acetats (26a) wurde eingedampft und bei pH 6 mit 2 ml Wasser, 4 ml Methanol und 222 mg p-Bromphenacylbromid (0,800 mMol) während 2,5 Std. unter Rückfluss gekocht. Nach Abdampfen der Lösungsmittel wurde das Reaktionsprodukt in Methylenchlorid aufgenommen und die löslichen organischen von den unlöslichen, anorganischen Verbindungen abfiltriert. Das Filtrat wurde eingedampft und ergab 205 mg Rohprodukt, das durch aufeinanderfolgende PDC mit Benzol/Methanol 97:3 und Benzol (2-mal) getrennt wurde. Neben p-Bromphenacylalkohol und unumgesetztem p-Bromphenacylbromid wurden 23,5 mg Benzoesäurephenacylester (27) (0,0736 mMol, 54 % d. Th.) und 36 mg Essigsäurephenacylester (28) (0,140 mMol, 34 % d. Th.) erhalten.

Der aus Chloroform/Petroläther umkristallisierte Benzoesäurephenacylester (27) schmolz bei $116 - 117^\circ$ und war nach Smp., Mischsmp., DC und Massenspektrum mit authentischer Vergleichssubstanz identisch.

Der aus Petroläther umkristallisierte Essigsäurephenacylester (28) schmolz bei $84 - 85^\circ$ und war nach Smp., Mischsmp., DC und Massenspektrum mit authentischer Vergleichssubstanz identisch.

Massenspektrum von 27: u.a. Spitzen bei m/e 320/318 (M^+); 199/197 ($Br-C_6H_4-CO-CH_2$); 185/183 ($Br-C_6H_4-CO$, Basisspitze); 157/155 ($Br-C_6H_4$); 105 (C_6H_5-CO).

Massenspektrum von 28: u.a. Spitzen bei m/e 258/256 (M^+); 199/197; 185/183 (Basisspitze); 157/155.

5. Abbausequenz 3

5.1. Ozonolyse von Cytochalasin D (5) mit reduktiver Spaltung der Ozonide mit $NaBH_4$

Durch eine Lösung von 409 mg Cytochalasin D (5) (0,806 mmol) in 60 ml Methanol wurde bei -75° ein O_3/C_2 -Strom geleitet (Fließgeschwindigkeit 200 ml O_2 /Min., Ozongehalt 0,4 mmol/Min.) bis intensive Blaufärbung auftrat (10 Min., 175 % O_3). Die kalte Lösung der Ozonide wurde mit 1,01 g $NaBH_4$ in kleinen Portionen unter Rühren versetzt. Nach 1 Std. hatte sich die Lösung auf Raumtemperatur erwärmt und enthielt keine Ozonide (Test mit KI-Stärkepapier) mehr. Die methanolische Lösung wurde mit 30 ml 2N H_2SO_4 und 30 ml Wasser versetzt und im Vakuum auf 70 ml eingengt. Extraktion im Kutscher-Steudel-Apparat mit Methylenchlorid während 10 Tagen, Trocknen des Extrakts über Na_2SO_4 und Eindampfen lieferte 422 mg Gemisch der Ozonolysenbruchstücke als fast farbloses, zähflüssiges Harz, welches im DC (Methylenchlorid/Methanol 80:20) im wesentlichen drei Flecke zeigte.

5.2. Acetylierung des Ozonolysengemisches

Eine Lösung von 422 mg Ozonolysengemisch in 6 ml abs. Pyridin und 4 ml Acetanhydrid wurde während 60 Std. bei 60° stehen gelassen, wobei sich das Gemisch dunkel färbte. Achtmaliges Abdampfen mit Benzol und dreimaliges Abdampfen mit Methylenchlorid im Vakuum lieferte das Gemisch der acetylierten Ozonolysenprodukte als hellbraunes Harz (587 mg).

5.3. Trennung des acetylierten Ozonolysengemisches

Das acetylierte Gemisch der Ozonolysenprodukte wurde an 50 g Kieselgel chromatographiert. Die mit Methylenchlorid/Methanol 99:1 eluierten Fraktionen Nr. 8 - 22 (Fraktionengrösse 100 ml) enthielten das N-Acetyl-penta-O-acetyl- γ -lactam 30; 1,2,3,6-Tetraacetoxy-2,4-dimethyl-hexan (33); 1,3,6-Triacetoxy-2,4-dimethyl-hexan-2-ol (32) und das Penta-O-acetyl- γ -lactam 29 in dieser Elutionsreihenfolge. Die mit Methylenchlorid/Methanol 98:2 eluierten Fraktionen Nr. 23 - 27 enthielten 1,6-Diacetoxy-2,4-dimethyl-hexan-2,3-diol (31). Die Verbindungen wurden alle durch PDC weitergetrennt oder gereinigt. Die acetylierten Hexantetrole 31, 32 und 33 wurden zusätzlich durch eine Hochvakuumdestillation im Kugelrohr (0,01 Torr, 150°) gereinigt (vgl. Schema S. 89). Die Ausbeuten betrugen für das Gemisch der Acetyl- γ -lactame 29 und 30 62 % d. Th. und für das Gemisch der acetylierten Hexantetrole 31, 32 und 33 69 % d. Th.

Charakterisierung der Reaktionsprodukte:

Penta-O-acetyl- γ -lactam 29:

$[\alpha]_D^{24} = -33^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,171$ in Chloroform).

IR.-Spektrum (CHCl_3): u.a. Banden bei 3600 - 3200 (NH, assoz.); 3420 (NH); 3050 (Arom.); 2980, 2950 (CH); 1740, 1705 (C=O, Ester, Lactam); 1610, 1500 (Arom.); 1430, 1370; 1240 (C-O-C) cm^{-1} .

NMR.-Spektrum (100 MHz, CDCl_3): u.a. Signale bei 7,3 (m, 5H, Phenylrest); 5,9 (s, 1H, N(2), tauscht mit D_2O aus); 4,3 (AB-System, verdoppelt, 2H, C(13), $J_{\text{gem}} = -12$ Hz, $J_{8,13} = 6$ Hz); 6,0 - 3,5 (div. m, 6H); 3,5 - 2,5 (m, 3H); 2,1 (m, 15H, Acetoxy); 1,2 (d, 1,2H) und 1,04 (d, 1,8H; C(11), $J_{5,11} = 7$ Hz) ppm.

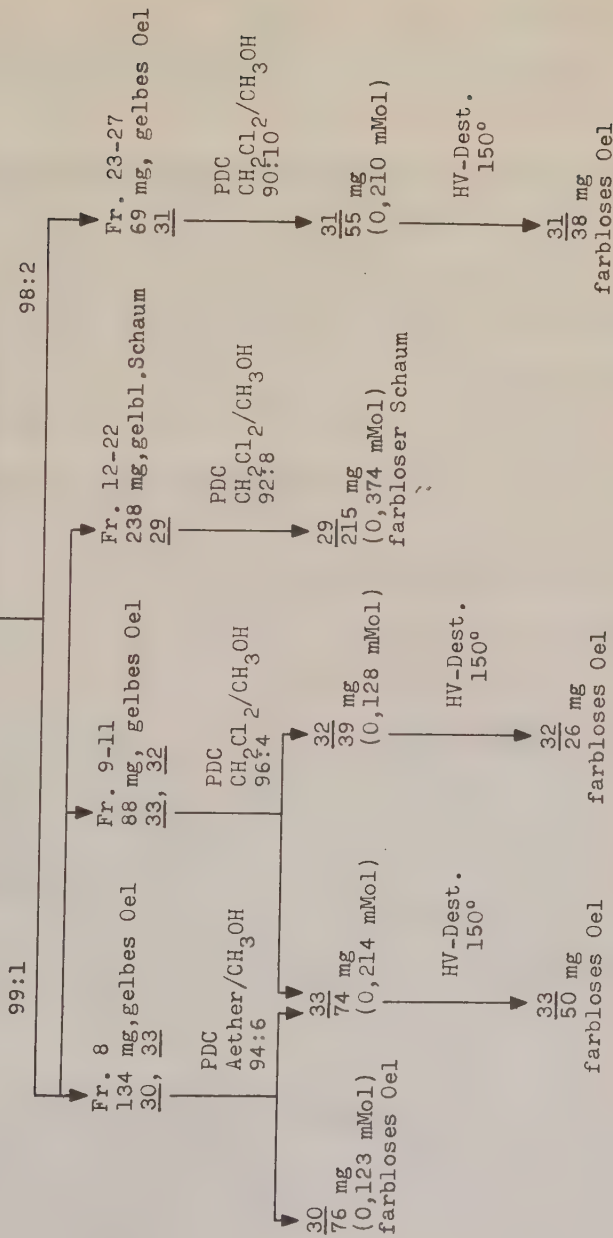
Massenspektrum: u.a. Spitzen bei m/e 575 (M^+); 532 ($\text{M}^+ - 43$, Acetyl); 516 ($\text{M}^+ - 59$, Acetoxy); 484 ($\text{M}^+ - 91$, Benzyl); 441 ($\text{M}^+ - 134$, Benzyl + Acetyl); 425 ($\text{M}^+ - 150$, Benzyl + Acetoxy); 382 ($\text{M}^+ - 193$, Benzyl + Acetoxy + Acetyl); 340; 174; 120; 105; 91 (Basisspitze).

Trennung der acetylierten Ozonolysenbruchstücke

Acetyliertes Ozonolysengemisch (587 mg)

SC an 50 g Kieselgel
Fraktionen zu 100 ml

Methylenchlorid/Methanol



N-Acetyl-penta-O-acetyl- γ -lactam 30:

IR.-Spektrum (CHCl_3): u.a. Banden bei 3050 (Arom.); 2980, 2950 (CH); 1740, 1710 (C=O ; Ester, Lactam); 1610, 1500 (Arom.); 1370; 1240 (C-O-C) cm^{-1} .

NMR.-Spektrum (60 MHz, CDCl_3): u.a. Signale bei 7,3 (m, 5H, Phenylrest); 4,3 (AB-System, verdoppelt, 2H, C(13), $J_{\text{gem}} = -12$ Hz, $J_{8,13} = 6$ Hz); 6,0 - 3,5 (div. m, 6H); 3,5 - 2,5 (m, 3H); 2,1 (m, 18H, N-Acetyl und Acetoxy); 1,2 (d, 1,2H) und 1,04 (d, 1,8H, C(11), $J_{5,11} = 7$ Hz) ppm.

Massenspektrum: u.a. Spitzen bei m/e 617 (M^+); 574 ($\text{M}^+ - 43$, Acetyl); 557 ($\text{M}^+ - 60$, Essigsäure); 526 ($\text{M}^+ - 91$, Benzyl); 514 ($\text{M}^+ - 103$, Essigsäure + Acetyl); 483 ($\text{M}^+ - 134$, Benzyl + Acetyl); 466 ($\text{M}^+ - 151$, Benzyl + Essigsäure); 423 ($\text{M}^+ - 194$, Benzyl + Essigsäure + Acetyl); 382; 216; 174; 120; 105; 91 (Basisspitze).

1,6-Diacetoxy-2,4-dimethyl-hexan-2,3-diol (31):

IR.-Spektrum (CHCl_3): u.a. Banden bei 3600 - 3200 (OH assoz.); 3520 (OH); 2970, 2940, 2890, 2850 (CH); 1730 (C=O); 1370; 1240 (C-O-C); 1040 (C-O-H) cm^{-1} .

NMR.-Spektrum (60 MHz, CDCl_3): u.a. Signale bei 4,2 (AB-System, 2H, C(19), $J_{\text{gem}} = -12$ Hz); 4,1 (t, 2H, C(14), $J_{14,15} = 6$ Hz); 4,0 (d, 1H, C(17), $J_{16,17} = 5$ Hz); $\sim 2,8$ und $\sim 2,1$ (je 1H, OH, tauscht mit D_2O aus); 2,1 (s, verdoppelt, 6H, Acetoxy); 2,0 - 1,5 (m, 3H, C(15) und C(16)); 1,3 (s, 3H, Methyl an C(18)); 1,1 (d, 3H, Methyl an C(16), $J = 7$ Hz) ppm.

Massenspektrum: u.a. Spitzen bei m/e 262 (M^+); 244 ($\text{M}^+ - 18$, H_2O); 226 ($\text{M}^+ - 36$, $2\text{H}_2\text{O}$); 202 ($\text{M}^+ - 60$, Essigsäure); 142 ($\text{M}^+ - 120$, 2 Essigsäure, Basisspitze).

1,3,6-Triacetoxy-2,4-dimethyl-hexan-2-ol (32):

IR.-Spektrum (CHCl_3): u.a. Banden bei 3600 - 3300 (OH assoz.); 2980, 2950, 2895 (CH); 1730 (C=O); 1370; 1250 (C-O-C); 1050 (C-O-H) cm^{-1} .

Massenspektrum: u.a. Spitzen bei m/e 286 (M^+ -18, H_2O , Basis-spitze); 245 (M^+ -59, Acetoxy); 227 (M^+ -77, Acetoxy + H_2O); 185 (M^+ -119, 2 Acetoxy); 143 (M^+ -161, 2 Acetoxy + Acetyl); 125 (M^+ -179, 3 Acetoxy, Basisspitze).

1,2,3,6-Tetraacetoxy-2,4-dimethyl-hexan (33):

IR.-Spektrum (CCl_4): u.a. Banden bei 2980, 2940, 2890, 2850 (CH); 1740 (C=O); 1370; 1230 (C-O-C) cm^{-1} .

Massenspektrum: u.a. Spitzen bei m/e 174 (M^+ -172, 4 Acetyl); 110 (M^+ -236, 4 Acetoxy); 85 (Basisspitze).

6. Abbausequenz 4

6.1. Hydrolytische Spaltung von Cytochalasin D.(5)

Eine Lösung von 334 mg Cytochalasin D (5) (0,660 mMol) in 20 ml Methanol und 4 ml Wasser wurde mit 508 mg K_2CO_3 (3,70 mMol) versetzt und unter Stickstoff während 96 Std. unter Rückfluss gekocht. Die braune Lösung wurde mit 30 ml Wasser verdünnt und im Vakuum auf die Hälfte eingedampft. Fünfmalige Extraktion mit Chloroform im Basischen lieferte nach Trocknen des Extrakts über Na_2SO_4 und Eindampfen im Vakuum 44 mg Neutralkörper (gelbes Öl), der verworfen wurde. Die wässrige Phase wurde anschliessend mit 2N HCl sauer gestellt, fünfmal mit Chloroform und dreimal mit Äther extrahiert. Aus den vereinigten Extrakten wurden nach Trocknen über Na_2SO_4 und Eindampfen im Vakuum 235 mg Säurengemisch gewonnen (hellbrauner Schaum), das im DC (Methylenchlorid/Methanol 95:5 und Benzol/Methanol 90:10) im wesentlichen zwei Flecke zeigte.

6.2. Veresterung des Säurengemisches mit Diazomethan

Eine Lösung von 235 mg Säurengemisch in 10 ml Methanol wurde bei 0° mit trockener ätherischer Diazomethanlösung versetzt, bis keine Stickstoffentwicklung mehr beobachtet wurde.

Eindampfen der Reaktionslösung, Aufnahme in Essigester und Waschen mit 2N Na_2CO_3 und Wasser lieferte nach Trocknen der Lösung über Na_2SO_4 und Eindampfen im Vakuum 234 mg Methylestergemisch (hellbrauner Schaum).

Das Methylestergemisch wurde an 25 g Kieselgel chromatographiert. Die mit Methylenchlorid/Methanol 99:1 eluierten Fraktionen Nr. 7 - 10 (Fraktionengrösse 50 ml) enthielten 62 mg des ring-trans-verknüpften Methylesters 36. Die mit Methylenchlorid/Methanol 98:2 eluierten Fraktionen Nr. 13 - 18 enthielten 136 mg des ring-cis-verknüpften Methylesters 35. Die totale Ausbeute an isomeren Methylestern betrug 198 mg (0,502 mmol, 76 % d. Th.).

Nach Reinigung durch aufeinanderfolgende PDC mit Methylenchlorid/Methanol 92:8 und Benzol/Methanol 86:14 resultierten 36 als farbloses Öl (49 mg) und 35 als farbloser Schaum (108 mg). 35 wurde aus Äther durch langsames Eindampfen der Lösung in feinen, farblosen Nadeln vom Smp. 108 - 110° erhalten.

cis-Methylester 35:

Rf = 0,30 (Methylenchlorid/Methanol 92:8), Smp. 108 - 110°,
[α]_D²⁴ = + 56° ± 2° (c = 1,14 in Methanol)
[α]_D²⁴ = + 18° ± 2° (c = 1,17 in Dioxan)
[α]_D²⁴ = + 16° ± 2° (c = 1,19 in Chloroform)

IR.-Spektrum (CCl_4): u.a. Banden bei 3520 (OH); 3440 (NH); 3600 - 3200 (OH, NH assoz.); 3200; 3080 ($\text{C}=\text{CH}_2$); 3040 (Arom.); 2980, 2940, 2890, 2860 (CH); 1730, 1690 ($\text{C}=\text{O}$; Ester, Lactam); 1605, 1500 (Arom.); 1205; 1170 ($\text{C}-\text{O}-\text{C}$); 1030 ($\text{C}-\text{O}-\text{H}$); 980, 910, 705 (monosubst. Arom.) cm^{-1} .

NMR.-Spektrum (100 MHz, CDCl_3): u.a. Signale bei 7,25 (m, 5H, Phenylrest); 6,04 (AB-System, verdoppelt und verbreitert, 1H, C(13), $J_{13,14} = 15$ Hz, $J_{8,13} = 9$ Hz, $J_{\text{all}} = 1$ Hz); 5,78 (s, 1H, N(2), tauscht mit D_2O aus); 5,56 (AB-System, verdreifacht und verbreitert, 1H, C(14), $J_{13,14} = 15$ Hz, $J_{14,15} = 7$ Hz,

$J_{all} = 1 \text{ Hz}$); 5,27 (s, 1H, C(12)); 5,08 (s, 1H, C(12)); 4,03 (d, 1H, C(7), $J_{7,8} = 9 \text{ Hz}$); 3,67 (s, 3H, Methoxy); 3,45 (m, 1H, C(5)); 3,0 - 2,2 (m, 1OH); $\sim 2,5$ (1H, OH, tauscht mit D_2O aus); 1,16 (d, 3H, Methyl an C(16), $J = 9 \text{ Hz}$); 1,10 (d, 3H, C(11), $J_{5,11} = 9 \text{ Hz}$) ppm.

Massenspektrum: u.a. Spitzen bei m/e 397 (M^+); 379 ($M^+ - 18$, H_2O); 366 ($M^+ - 31$, Methoxy); 348 ($M^+ - 49$, $H_2O + \text{Methoxy}$); 337 ($M^+ - 60$, CH_3OCHO); 310 ($M^+ - 87$, $CH_3OCO-CH-CH_3$); 306 ($M^+ - 91$, Benzyl); 288 ($M^+ - 109$, Benzyl + H_2O); 274 ($M^+ - 123$, Phenethyl + H_2O); 246 ($M^+ - 151$, Benzyl + CH_3OCHO); 174 (Basisspitze); 120; 105; 91.

trans-Methylester 36:

$R_f = 0,45$ (Methylenchlorid/Methanol 92:8), amorph,

$[\alpha]_D^{24} = + 39^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,69$ in Methanol)

$[\alpha]_D^{24} = + 11^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 0,68$ in Dioxan)

$[\alpha]_D^{24} = - 22^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,78$ in Chloroform)

IR.-Spektrum (CCl_4): u.a. Banden bei 3540 (OH); 3440 (NH); 3600 - 3200 (OH, NH assoz.); 3220; 3080 ($C=CH_2$); 3040 (Arom.); 2980, 2940, 2890, 2860 (CH); 1730, 1710 ($C=O$; Ester, Lactam); 1605, 1500 (Arom.); 1205; 1175 ($C-O-C$); 1040 ($C-O-H$); 970, 915; 705 (monosubst. Arom.) cm^{-1} .

NMR.-Spektrum (100 MHz, $CDCl_3$): u.a. Signale bei 7,25 (m, 5H, Phenylrest); 5,89 (s, 1H, N(2), tauscht mit D_2O aus); 5,69 (AB-System, verdoppelt, 1H, C(13), $J_{13,14} = 16 \text{ Hz}$, $J_{8,13} = 9 \text{ Hz}$); 5,51 (AB-System, verdreifacht, 1H, C(14), $J_{13,14} = 16 \text{ Hz}$, $J_{14,15} = 7 \text{ Hz}$); 5,23 (t, 1H, C(12), $J_{all} = 2 \text{ Hz}$); 4,94 (t, 1H, C(12), $J_{all} = 2 \text{ Hz}$); 3,86 (dt, 1H, C(7), $J_{7,8} = 9 \text{ Hz}$, $J_{all} = 2 \text{ Hz}$); 3,68 (s, 3H, Methoxy); 3,60 (m, 1H, C(5)); 3,1 - 1,8 (m, 1OH); $\sim 2,8$ (1H, OH, tauscht mit D_2O aus); 1,22 (d, 3H, Methyl an C(16), $J = 7 \text{ Hz}$); 1,09 (d, 3H, C(11), $J_{5,11} = 7 \text{ Hz}$) ppm.

Massenspektrum: u.a. Spitzen bei m/e 397 (M^+); 379; 366; 348; 337; 310 (Basisspitze); 306; 288; 274; 246; 174; 120; 105; 91; (Abspaltungen vgl. MS von 35).

7. Abbausequenz 5

7.1. Dihydrocytochalasin P (37)

Eine Lösung von 401 mg Cytochalasin D (5) (0,790 mmol) in 80 ml Äthanol wurde unter Rühren bei Raumtemperatur während 1 Std. mit 150 mg NaBH_4 in kleinen Portionen versetzt. Nach einer weiteren Std. Rühren wurde die Lösung 5 Std. bei Raumtemperatur stehengelassen. Dann wurde die Lösung mit 50 ml Wasser verdünnt, das Äthanol im Vakuum abgedampft und, nach Ansäuern mit 2N HCl, die wässrige Phase mit Methylenchlorid fünfmal ausgeschüttelt. Waschen der Extrakte mit 2N Na_2CO_3 und Wasser, Trocknen über Na_2SO_4 und Eindampfen des Lösungsmittels ergab 271 mg Rohprodukt. Aus der Reinigung des Rohproduktes durch FDC mit Äther-Methanol 93:8 resultierte ein Gemisch der beiden an C(17) isomeren Dihydrocytochalasine D (37) als farbloser Schaum (245 mg, 0,480 mmol, 61 % d.Th.).

UV.-Spektrum (Äthanol): Maxima bei 245 (2,73); 252 (2,88); 258 (2,84); 264 (2,58) und 268 (2,42) nm (log ϵ).

IR.-Spektrum (CHCl_3): u.a. Banden bei 3600 (OH); 3420 (NH); 3600 - 3500 (OH, NH assoz.); 3090 ($\text{C}=\text{CH}_2$); 3050 (Arom.); 2970, 2940, 2890 (CH); 1730, 1685 (C=O; Ester, Lactam); 1605, 1500 (Arom.); 1375; 1240 (C-O-C); 1000 (C-O-H); 915 cm^{-1} .

Massenspektrum: u.a. Spitzen bei m/e 509 (M^+); 491 (M^+-18 , H_2O); 473 (M^+-36 , PH_2O); 449 (M^+-60 , Essigsäure); 418 (M^+-91 , Benzyl); 400 (M^+-109 , Benzyl + H_2O); 358 (M^+-151 , Benzyl + Essigsäure); 340 (M^+-169 , Benzyl + Essigsäure + H_2O); 322 (M^+-187 , Benzyl + Essigsäure + PH_2O); 240; 174; 172; 120; 105; 91 (Basisspitze).

7.2. Periodatspaltung von Dihydrocytochalasin P (37)

Eine Lösung von 161 mg 37 (0,327 mmol) in 20 ml Methanol und 5 ml Wasser wurde mit 149 mg H_5IO_6 (0,654 mmol) versetzt und 24 Std. unter Rückfluss gekocht. Die Lösung wurde dann

zur Trockne eingedampft und der Rückstand in Wasser aufgenommen. Fünfmalige Extraktion mit Methylenchlorid lieferte einen violett gefärbten Auszug (J_2 in CH_2Cl_2), der zur Entfärbung mit 1-proz. $Na_2S_2O_3$ -Lösung dreimal gewaschen wurde. Trocknen über Na_2SO_4 und Eindampfen ergab 160 mg gelben Schaum, der durch PDC mit Methylenchlorid/Methanol 92:8 in 80 mg Edukt (37) (0,157 mMol, 48 % d. Th.) und 52 mg 17,18-seco-Aldehyd 38 (0,103 mMol, 31 % d. Th.) getrennt wurde.

UV.-Spektrum (Aethanol): Maxima bei 231 (3,95); 252 (2,85); 258 (2,79); 264 (2,55) und 268 (2,40) nm (log ϵ).

IR.-Spektrum ($CHCl_3$): u.a. Banden bei 3600 (OH); 3420 (NH); 3600 - 3200 (OH, NH assoz.); 3080 ($C=CH_2$); 3050 (Arom.); 2990, 2940, 2890, 2850 (CH); 2820, 2730 (CHO); 1740, 1725, 1705, 1695 ($C=C$; Ester, Aldehyd, Keton, Lactam); 1640 ($C=C$ konj.); 1610, 1500 (Arom.); 1380; 1240 (C-O-C); 1080 (C-O-H); 915 cm^{-1} .

7.3. Jodoformreaktion von 38

Zu einer Lösung von 50 mg 38 (0,099 mMol) in 2,5 ml Dioxan und 0,5 ml 10-proz. NaOH-Lösung wurde eine KJ- J_2 -Lösung (2 g KJ und 1 g J_2 in 10 ml Wasser) solange zugetropft, bis die Braunfärbung bei 60° beständig war. Dann wurde die Lösung mit 10-proz. NaOH-Lösung wieder entfärbt und mit Wasser verdünnt. Es entstand eine milchige Trübung, wobei der typische Jodoformgeruch wahrnehmbar wurde. Fünfmalige Extraktion mit Methylenchlorid, Trocknen der Extrakte über Na_2SO_4 und Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum bei 40° lieferte ein braunes Harz, aus dem durch Sublimation im Hochvakuum (0,01 Torr, 130°) 3,50 mg Jodoform (40) (0,0089 mMol, 9 % d. Th.) gewonnen wurde. 40 kristallisierte aus Methanol in kleinen, gelben Plättchen vom Smp. 120 - 121°, die nach Smp., Mischsmp. und DC mit authentischer Vergleichssubstanz identisch waren.

Beim Abbau von radioaktivem 38 wurde das radioaktive Jodoform (40) (3,50 mg) mit inaktivem Jodoform (37,00 mg) verdünnt und das Gemisch aus Methanol umkristallisiert. Es resultierten 36 mg eines Jodoform-Präparats 40' mit dem

Verdünnungsparameter 11,57, welches für die Radioaktivitätsmessung verwendet wurde.

8. Das 22-Oxa-[12]cytochalasan 41

388 mg krist. einheitliches Desacetylcytochalasin D (24) (0,856 mMol), das während fünf Tagen dem Einfluss von Licht und Luft ausgesetzt war, wurde mittels PDC (Methylenchlorid/Methanol 90:10) getrennt. Es resultierten 286 mg Edukt (24) (0,614 mMol, 72 % d.Th.) und 47 mg 41 (0,098 mMol, 11,5 % d. Th.), welches zur weiteren Reinigung aus Essigester mit Petroläther gefällt wurde. Daraus resultierte 41 mg reines 41 (0,0855 mMol, 10 % d.Th.) als amorpher, farbloser Festkörper. Aus diesem konnte durch vorsichtiges Umkristallisieren aus Essigester 10 mg 41 in Form von farblosen Prismen vom Smp. 240 - 243° gewonnen werden. Die Mutterlaugen wurden durch PDC mit Methylenchlorid/Methanol 92:8 gereinigt. Die grobe Trennung der Isomeren 41a und 41b gelang durch PDC mit Äther/Methanol 96:4; wegen Substanzmangel wurde jedoch eine weitere Trennung nicht durchgeführt.

Rf ~ 0,05 > Rf von Cytochalasin D (5) (Methylenchlorid/Methanol 90:10, Benzol/Methanol 88:12, Äther/Methanol 96:4), typische blau-violette Anfärbung nach Besprühen mit äthanolischer p-Toluolsulfonsäure-Lösung und anschliessendem Erwärmen der DC-Platte.

UV.-Spektrum (Äthanol): Maxima bei 208 (3,85); 251 (2,55); 258 (2,47); 264 (2,37); 267 (2,32); 281 (2,13) nm (log ε).

IR.-Spektrum (KBr): u.a. Banden bei 3380 (NH); 3260; 3600 - 3200 (OH, NH assoz.); 3080 (C=CH₂); 3020 (Arom.); 2960, 2930, 2910, 2870, 2850 (CH); 1730, 1710, 1695 (C=O; α,β-unges. Ester, Keton, Lactam); 1640 (C=C konj.); 1600, 1490 (Arom.); 1445, 1365; 1180 (C-O-C); 1060, 1020 (C-O-H); 920; 755, 695 cm⁻¹.

NMR.-Spektrum (90 MHz mit Fourier-Transform, CDCl₃): vgl. Fig. 7.

Massenspektrum (hochaufgelöst): vgl. Tabelle 6.

Molekel-Ion bei m/e 479,2309; C₂₈H₃₃NO₆ ber. 479,2308.

C. ZUSAMMENFASSUNG

Zur Ermittlung der Biosynthese von Cytochalasin D (5), einem Vertreter der carbocyclischen [11]Cytochalasane, wurden zu Kulturen von Zygosporium masonii eine Anzahl potentieller biogenetischer Vorläufer in radioaktiver Form zugegeben, nachdem die günstigsten Kulturbedingungen für den Organismus und die Bildungskurve des Metaboliten ermittelt waren. Verabreicht wurden [$4'$ - ^3H][U - ^{14}C]-L-Phenylalanin, [CH_3 - ^{14}C]-L-Methionin, [1 - ^{14}C]- und [2 - ^{14}C]-Na-Malonat, [1 - ^{14}C]- und [2 - ^{14}C]-Na-Acetat und [2 - ^{14}C]-Na-Propionat. Das Phenylalanin und Methionin wurden sehr gut, das Acetat und Propionat gut und das Malonat schlecht in Cytochalasin D (5) eingebaut. "

Die nach Einbau von Phenylalanin und Methionin erhaltenen radioaktiven Präparate von Cytochalasin D (5) wurden einem gezielten chemischen Abbau unterworfen, um die Verteilung der Radioaktivität in der Molekel zu bestimmen.

Katalytische Hydrierung von Cytochalasin D (5) mit Pt in Eisessig führte zum Dodecahydrocytochalasin D (16), das mit K_2CO_3 in wässrigem Methanol zu Desacetyldodecahydrocytochalasin D (17) hydrolysiert wurde. Aus dem Kuhn-Roth-Abbau von 17 resultierte die Essigsäure 18, deren Na-Salz 19 nach Schmidt zu CO_2 (20) (C-Atome Nr. 5, 6, 16, 18) und Methylamin (22) (C-Atome Nr. 11, 12 und Methylgruppen an C(16) und C(18)) weiter abgebaut wurde.

Hydrolyse von Cytochalasin D (5) mit K_2CO_3 in wässrigem Methanol lieferte Desacetylcytochalasin D (24), dessen Abbau nach Kuhn-Roth die Benzoesäure 25 (Phenyl-C(10)-gruppierung) und die Essigsäure 26 (C-Atome Nr. 5, 11, 16, 18 und Methylgruppen an C(16) und C(18)) ergab. Beide Säuren wurden in Form ihrer p-Bromphenacyl ester 27 bzw. 28 isoliert.

Ozonolyse von Cytochalasin D (5) und Spaltung der Ozonide mit NaBH_4 lieferte ein Gemisch von Polyalkoholen, die nach Acetylierung getrennt wurden. Es resultierten einerseits das Penta-O-acetyl- γ -lactam 29 und das N-Acetyl-penta-O-acetyl- γ -lactam 30, welche beide die C-Atome Nr. 5, 6 und 11 enthalten, und andererseits die di-, tri- und tetraacetylierten Hexantetrole 31, 32 und 33, welche alle drei die C-Atome Nr. 16 und 18 und die Methylgruppen an C(16) und C(18) erfassen.

Behandlung von Cytochalasin D (5) mit K_2CO_3 in wässrigem Methanol führte nach Veresterung mit Diazomethan zu den zwei an C(9) isomeren Methylestern 35 und 36. Diese Methylester enthalten die C-Atome Nr. 5, 6, 11, 12, 16 und die Methylgruppe an C(16).

Reduktion von Cytochalasin D (5) mit NaBH_4 in Aethanol lieferte Dihydrocytochalasin D (37), das mit Perjodsäure zum 17,18-seco-Aldehyd 38 gespalten wurde. Durch die Jodoformreaktion an 38 wurde die Methylgruppe an C(18) selektiv erfasst (CHJ_3 40 und 40').

Damit lassen sich die Phenyl-C(10)-gruppierung und die Methylgruppe an C(18) einzeln bestimmen; die 11-Methyl-, 12-Methylen- und Methylgruppe an C(16) gehen aus Differenzbildungen hervor.

Aus den Resultaten der Ein- und Abbauprobversuche folgt der biosynthetische Aufbau von Cytochalasin D (5). Die Grundbausteine sind Phenylalanin, Acetat und Methionin (als C_1 -Lieferant). Phenylalanin wird als Ganzes, d.h. ohne vorherige Decarboxylierung eingebaut. Obwohl die mit Acetat markierten Cytochalasin D (5)-Muster noch nicht abgebaut wurden, kann angenommen werden, dass Acetat zunächst ein Oktaketid bildet, das nach mehreren Kondensations- und Reduktionsschritten zusammen mit Phenylalanin das Grundgerüst von Cytochalasin D (5) ergibt. Die 12-Methylengruppe und die Methylgruppen an C(16) und C(18) stammen aus Methionin und werden wahrscheinlich

erst zu einem späteren Zeitpunkt in das Grundgerüst eingeführt.

Die Analogie des biosynthetischen Aufbaus von Cytochalasin D (5) mit dem von Phomin (2) erhärtet das hypothetische Biogeneseschema der Cytochalasane.

Beim Stehenlassen von krist. Desacetylcytochalasin D (24) an Licht und Luft bildete sich das 22-Oxa-[12]cytochalasan 41, dessen Struktur aus den Spektraldaten abgeleitet wurde. 41 ist ein Gemisch der zwei an C(9) isomeren makrocyclischen Lactone 41a (7S,16S,18R)-7,18-Dihydroxy-16,18-dimethyl-10-phenyl-22-oxa-[12]cytochalasa-6(12),13^t,19^t-trien-1,17,21-trion und 41b (7S,16S,18R)-7,18-Dihydroxy-16,18-dimethyl-10-phenyl-22-oxa-9-epi-[12]cytochalasa-6(12),13^t,19^t-trien-1,17,21-trion.

Damit ist der erste Vertreter der [12]Cytochalasane bekannt geworden. Ein möglicher Bildungsmechanismus wird vorgeschlagen.

D. LITERATURVERZEICHNIS

- [1] W. Rothweiler und Ch. Tamm, *Experientia* 22, 750 (1966).
- [2] W. Rothweiler und Ch. Tamm, *Helv.* 53, 696 (1970).
- [3] D. C. Aldridge, J. J. Armstrong, R. N. Speak und W. B. Turner, *Chem. Comm.* 1967, 26.
- [4] D. C. Aldridge, J. J. Armstrong, R. N. Speak und W. B. Turner, *J. chem. Soc. (C)* 1967, 1667.
- [5] G. M. McLaughlin, G. A. Sim, J. R. Kiechel und Ch. Tamm, *Chem. Comm.* 1970, 1398.
- [6] D. C. Aldridge und W. B. Turner, *J. chem. Soc. (C)* 1969, 923.
- [7] S. Hayakawa, T. Matsushima, T. Kimura, H. Minato und K. Katagiri, *J. Antibiotics* 21, 523 (1968).
- [8] H. Minato und M. Matsumoto, *J. chem. Soc. (C)* 1970, 38.
- [9] D. C. Aldridge und W. B. Turner, *J. Antibiotics* 22, 170 (1969).
- [10] Y. Tsukuda, M. Matsumoto, H. Minato und H. Koyama, *Chem. Comm.* 1969, 41.
- [11] Y. Tsukuda und H. Koyama, *J. C. S. Perkin II* 1972, 739.
- [12] H. Minato und T. Katayama, *J. chem. Soc. (C)* 1970, 45.
- [13] D. C. Aldridge, B. F. Burrows und W. B. Turner, *J. C. S. Chem. Comm.* 1972, 148.
- [14] D. C. Aldridge, D. Greatbanks und W. B. Turner, *J. C. S. Chem. Comm.* 1973, 551.
- [15] G. Büchi, Y. Kitaura, S. Yuan, H. E. Wright, J. Clardy, A. L. Demain, T. G. N. Hunt und G. N. Wogan, *J. Amer. chem. Soc.* 95, 5423 (1973).
- [16] M. Binder und Ch. Tamm, *Helv.* 56, 966 (1973).
- [17] M. Binder und Ch. Tamm, *Helv.* 56, 2387 (1973).

- [18] S. Sekita, K. Yoshihira, S. Natori und H. Kuwano, Tetra-
hedron Letters 1973, 2109.
- [19] M. Binder, Ch. Tamm, W. D. Turner und H. Minato, J. C. S.
Perkin I 1973, 1146.
- [20] M. Binder und Ch. Tamm, Angew. Chem. 9, 369 (1973); Inter-
nat. Ed. 12, 370 (1973).
- [21] S. B. Carter, Nature 213, 261 (1967).
- [22] G. F. Smith, M. A. C. Ridler und J. A. Faunch, Nature 216,
1134 (1967).
- [23] A. Krishan, J. Ultrastruct. Res. 36, 191 (1971).
- [24] S. Hayakawa, T. Matsushima, H. Minato und K. Hirose,
Brit. Pat. 1'160'846 (1969).
- [25] Minato, Hitoshi, Katayama und Tenaki
Japan. Pat. 72'01'924 (1972)
Japan. Pat. 72'01'925 (1972)
Japan. Pat. 72'08'533 (1972)
Japan. Pat. 72'14'219 (1972)
- [26] S. B. Carter, Endeavour 113, 77 (1972).
- [27] H. Grisebach, W. Hofheinz und J. Roy, Inst. Chem. 88,
332 (1964).
- [28] J. D. Bu'Lock, The Biosynthesis of Natural Products,
McGraw-Hill (1965).
- [29] B. D. Davis, Advances in Enzymology 16, 247 (1955).
- [30] D. B. Sprinson, Advances in Carbohydrate Chemistry 15,
235 (1960).
- [31] M. Binder, J. R. Kiechel und Ch. Tamm, Helv. 53, 1797
(1970).
- [32] J. D. Bu'Lock und P. T. Clay, Chem. Comm. 1969, 237.
- [33] M. Binder und Ch. Tamm, unpublizierte Versuche.
- [34] H. L. Barnett, Illustrated Genera of Imperfect Fungi,
2nd Edition, Burgess Publishing Company (1962).
- [35] A. T. Speare, Mycologia 12, 62 (1920).

- [36] T. Petch, Brit. Mycol. Soc. Trans. 16, 55 (1930).
- [37] G. Juhasz und Ch. Tamm, Helv. 44, 1072 (1961).
- [38] Ch. Thom und K. B. Rasper, A Manual of the Aspergilli, Williams and Wilkins Company (1945).
- [39] S. J. Hughes, C. M. I. Mycol. Paper 44, 15 (1951).
- [40] R. Kuhn und F. L'Orsa, Angew. Chem. 44, 847 (1931).
- [41] R. Kuhn und H. Roth, Ber. 66, 1274 (1933).
- [42] Pregl und Roth, Quantitative Organische Mikroanalyse, 7. Auflage, Springer-Verlag (1958).
- [43] Organic Reactions, Vol. III, 307 - 336, The Schmidt-Reaction.
- [44] J. J. Britt, Dissertation ETH 2948, 66 (1959).
- [45] L. F. Fieser und M. Fieser, Organic Chemistry, 3rd Edition, Reinhold Publishing Corporation (1956).
- [46] B. Bhacca und D. Williams, Application of NMR-Spectroscopy in Organic Chemistry, Holden-Day (1964).
- [47] P. W. Clutterbuck und F. Reuter, J. chem. Soc. 1935, 1467.
- [48] Organic Reactions, Vol. II, 341 - 375, Periodic Acid Oxidation.
- [49] F. Kalberer und J. Rutschmann, Helv. 44, 1956 (1961).
- [50] H. R. Mahler, Fatty Acids, K. S. Markley (Edit.) Inter-science (1964).
- [51] A. T. Nielsen, J. Org. Chem. 22, 1539 (1957).
- [52] A. I. Scott, Interpretation of the Ultraviolet Spectra of Natural Products, Pergamon Press (1964).
- [53] E. R. H. Jones, T.Y. Shen und M. C. Whiting, J. chem. Soc. 1950, 230.
- [54] K. U. Ingold, Chem Reviews 61, 563 (1961).
- [55] L. J. Durham, C. F. Wurster und H. S. Mosher, J. Amer. chem. Soc. 80, 332 (1958).
- [56] L. J. Durham und H. S. Mosher, J. Amer. chem. Soc. 82, 4537 (1960).

E. CURRICULUM VITAE

Am 15. Februar 1945 wurde ich, Claude-René Lebet, als Sohn des René Lebet, kaufm. Angestellter von Buttes/NE, und seiner Frau Alice geb. Le Bel, Primarlehrerin, in Neuchâtel geboren. Im Jahre 1947 zogen wir nach Basel, wo ich nach dem Besuch der Primarschule und des Realgymnasiums im März 1964 die Maturität Typus B erlangte.

Im Sommersemester 1964 immatrikulierte ich mich an der Universität Basel und begann mit dem Studium der Chemie. Im Herbst 1965 bestand ich das 1. Vordiplom (Org. Chemie, Anorg. Chemie, Mathematik); das 2. Vordiplom (Physik, Physiologie) legte ich im Herbst 1966 ab. Im Mai 1968 erwarb ich das Diplom in Chemie und begann im November 1968, nach einem viermonatigen Volontariat in der pharmazeutisch-analytischen Abteilung der Sandoz A.G., mit der Ausarbeitung der vorliegenden Dissertation unter der Leitung von Herrn Professor Tamm.

Im Sommer 1970 verheiratete ich mich mit Frl. Nicole Pauli, Drogistin, und 1971 kam unsere Tochter Véronique zur Welt.

Während eineinhalb Jahren hat mir die Schweizerische Gesellschaft für Chemische Industrie ein Doktorandenstipendium gewährt, wofür ich ihr herzlich danke. Drei Jahre lang bin ich als Unterrichtsassistent am Institut für Organische Chemie der Universität Basel tätig gewesen.

Folgenden Herren Professoren und Dozenten verdanke ich meine Ausbildung:

H. Balli, R. Battegay, G. Benedetti, M. Brenner, P. Buchner, H. Erlenmeyert, A. Ernst†, S. Fallab, C. Grob, P. Hemmerich, P. Hubert†, L. Jenny, A. Marxer, M. Monnier, A. Portmann, T. Reichstein, R. Schenkel, P. Schiess, H. Seiler, M. Staehelin, H. R. Striebel, Ch. Tamm, M. Thürkauf, R. Wizingert†, R. Zürcher.

